

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Medicina

TESIS DOCTORAL

**IMPLICACIÓN Y REGULACIÓN DE LAS
ISOFORMAS DE *p73* EN DISTINTAS ETAPAS DEL
PROCESO TUMOROGÉNICO. VALOR PRONÓSTICO
EN PACIENTES CON CÁNCER**

Raquel Díaz Martínez

(Madrid, 2011)

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Medicina

**IMPLICACIÓN Y REGULACIÓN DE LAS
ISOFORMAS DE *p73* EN DISTINTAS ETAPAS DEL
PROCESO TUMOROGÉNICO. VALOR PRONÓSTICO
EN PACIENTES CON CÁNCER**

Memoria de tesis que presenta

Raquel Díaz Martínez

Para optar al grado de Doctora

Directores de Tesis

Dra. Gemma Domínguez Muñoz

Dr. Félix Bonilla Velasco

Unidad de Genética Molecular del Cáncer
Servicio de Oncología Médica
Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda
Madrid

Dra. GEMMA DOMÍNGUEZ MUÑOZ, INVESTIGADORA CONTRATADA DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UAM Y EL Dr. FÉLIX BONILLA VELASCO, JEFE DE SECCIÓN DE ONCOLOGIA MÉDICA Y RESPONSABLE DE LA UNIDAD DE GENÉTICA MOLECULAR DEL CÁNCER DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO PUERTA HIERRO MAJADAHONDA, Y PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UAM,

CERTIFICAN: Que Doña RAQUEL DIAZ MARTINEZ, DNI 11841917E, Licenciada en Ciencias Biológicas, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación titulado “Implicación y regulación de las isoformas de *p73* en distintas etapas del proceso tumorogénico. Valor pronóstico en pacientes con cáncer”, y consideramos que reúne las condiciones necesarias para ser presentado y sometido a discusión ante el Tribunal correspondiente para optar al grado de Doctora por la Universidad Autónoma de Madrid.

Madrid, 18 de Diciembre de 2010

Dra. Gemma Domínguez Muñoz

Dr. Felix Bonilla Velasco

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas e instituciones que, de una forma u otra, me han apoyado para poder llegar hasta aquí y poder terminar mi Tesis; tanto a nivel profesional como a nivel personal que espero no olvidarme de nadie.

En primer lugar, agradezco al Dr. Félix Bonilla y a la Dra. Gemma Domínguez por darme la oportunidad de trabajar en el mundo de la investigación. Además de su especial interés en complementar mi formación científica con todos los medios a su alcance. A los Servicios de Oncología Médica, Cirugía General y Anatomía Patológica implicados en este estudio por su colaboración en el reclutamiento de pacientes y datos clínicos.

A mis compañeros de laboratorio por sus aportaciones científicas y por su trabajo en equipo, a Javier Silva, Vanesa García, Yolanda Lorenzo, Cristina Peña, Jose Miguel García, Mercedes Herrera, Irene García y Marta Rodríguez. Además de agradecer a los compañeros de Inmunología Tumoral, toda su ayuda en mis encrucijadas científicas, en especial a Ángel Cuesta y a Vanesa Alonso.

A mis amigos por todos los momentos de risas y descanso, que me han ayudado a despejarme para poder luego concentrarme en el trabajo, en especial, Javi, Raquel, Manu, Yoli, Angelines, Patuco, Ricardo, Ana y Edu, por todo su apoyo y consejos. A mis hermanos tanto a los que están a Titi y a Juan como a los que se fueron Jose y Víctor, aunque os fuisteis hace tiempo y demasiado jóvenes me dio tiempo a aprender muchas lecciones de vuestros errores, a todos os quiero mucho. A las dos niñas de mis ojos, que son Andrea y Roci, si no estuvierais en mi vida, os aseguro que mi vida no sería igual, vuestra alegría es contagiosa. A Montañi y Patri, porque con tanto hermano, me vino bien mas refuerzo femenino. A Julio por su apoyo incondicional y por soportar todas mis neuras. Y a mis padres, por todo lo que me han dado. Y un recuerdo especial a mis abuelos, en especial a mi abuelo Antonio, cuando te fuiste me sentí huérfana, ya no había nadie en casa cuando llegaba del cole.

A Julio

RESUMEN

Los cánceres de colon y mama son dos de las neoplasias más frecuentes en las sociedades occidentales, y llevan asociadas unas altas tasas de mortalidad. En este contexto, la identificación de marcadores moleculares que puedan ayudar bien a la detección temprana o bien a la predicción del comportamiento del tumor y su respuesta a la terapia es muy importante. Por lo tanto, el significado clínico de la alteración en los niveles de expresión de las isoformas de *p73* en estos tipos tumorales es de particular interés, así como su regulación y su implicación en las distintas vías de la tumorigénesis.

Aunque las variantes que mantienen el dominio de transactivación de *p73*, *TAp73*, presentan función supresora tumoral como *p53* (otro miembro de esta familia), las formas que pierden el dominio de transactivación, $\Delta TAp73$, ejercen un efecto oncogénico inactivando las propiedades supresoras de *TAp73* y *p53*. Además de este papel, se ha descrito que todas las formas $\Delta TAp73$ inducen la fosforilación *in vitro* de la proteína supresora tumoral del retinoblastoma (pRb), lo que conduce a la liberación de E2F. Es interesante que E2F-1 pueda activar la transcripción de *p73* a través de sus sitios de unión, localizados en regiones no codificantes de los dos promotores de *p73*. También se ha descrito que la isoforma específica $\Delta Np73$ promueve inmortalización en células primarias y coopera con *K-ras* oncogénico en la inducción de su transformación *in vivo*. Con esta información intentamos caracterizar el perfil de expresión de estos genes en tumores humanos con el fin de evidenciar su papel en la carcinogénesis humana. La sobreexpresión observada de las isoformas de *p73* en los tejidos tumorales y su asociación con parámetros patológicos de peor pronóstico apoyan claramente su implicación en el proceso tumorigénico de mama y colon. La correlación encontrada *in vivo* entre las variantes de *p73*, *p53* y *E2F-1* indican la existencia de una red funcional entre ellos que debe modular el contexto supresor u oncogénico celular.

Nuestra serie inicial de pacientes con cáncer de colon fue seguida una media de 70 meses con el fin de evaluar el impacto que los niveles de las isoformas de *p73* ejercen en la supervivencia libre de enfermedad y global de los pacientes. Adicionalmente se evaluó la asociación de genes diana de las variantes de *p73* relacionados con procesos de quimio-resistencia (*MDR1*, *HMG1* y *caspasa-1*) con la evolución de los pacientes. El hecho de que la sobreexpresión de $\Delta Ex2/3p73$ y $\Delta Np73$ se asocie con supervivencias globales más cortas indica su posible valor como marcador pronóstico, además de apoyar su papel oncogénico. La correlación observada entre las variantes $\Delta TAp73$ y *HMG1* y *MDR1* sugiere que estos podrían ser dianas de las isoformas de *p73* *in vivo*. Además, *HMG1* y *MDR1* predicen con potencia estadística similar al estadio tumoral la supervivencia global de manera independiente, lo que indica la importancia de identificar efectores de *p73* que podrían predecir la evolución de los pacientes de cáncer de colon mejor que las propias variantes $\Delta TAp73$.

Las isoformas de *p73* podrían también modular el proceso angiogénico. Existen datos discordantes en la literatura al respecto. Hay distintos trabajos que apoyan tanto la regulación negativa como la positiva de *VEGF* por *p73*. Con el fin de aclarar si las distintas variantes de *p73* ejercen efectos contrarios sobre la expresión de *VEGF* llevamos a cabo un estudio correlativo en nuestras series de pacientes. Además hemos evaluado si *VEGF_{165b}* y *PEDF*, ambas con función anti-angiogénica podrían estar reguladas diferencialmente por las distintas isoformas de *p73*. Finalmente hemos evaluado si ciertas alteraciones oncogénicas, como mutaciones en *p53*, activación de *K-ras* y los niveles de *E2F-1* podrían estar afectando a esta vía. Hemos observado una correlación directa entre los niveles de expresión de las distintas isoformas de *p73* y

VEGF y *VEGF_{165b}* e inversa con *PEDF*, lo que apoya su posible regulación por las variantes de *p73*. Este escenario se complica debido al mecanismo de retro-alimentación que puede existir entre *PEDF* y *VEGF*. Nuestros datos apoyan que *VEGF* podría afectar los niveles de *E2F-1*, y/o viceversa. Mientras que las mutaciones en *K-ras* podrían regular negativamente la expresión de *PEDF*, la sobreexpresión de *VEGF_{165b}* podría resultar de un mecanismo compensatorio ante la inactivación de *p53*. Nuestros resultados apoyan el papel de *VEGF_{165b}* como supresor tumoral y su posible valor como marcador pronóstico.

Debido a la relevancia que las isoformas de *p73* pueden tener en la evolución de los pacientes con cáncer, consideramos de vital importancia identificar mecanismos o componentes que puedan regular sus niveles. En nuestro estudio hemos observado que $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ regula negativamente a survivina y a las variantes de *p73* en líneas celulares de colon y mama. También observamos una regulación positiva de todas las isoformas de *p73* por survivina. Nuestros datos muestran que $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ regula negativamente a las distintas isoformas de *p73*, esta modulación puede ser dependiente de survivina, aunque no podemos descartar una regulación de *p73* por $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ independiente de survivina. Los resultados analizando los niveles de *EPRI* (localizado en la misma región cromosómica que survivina pero en sentido opuesto) apoyan el papel de *EPRI* como un posible anti-sentido natural de survivina y su posible papel como marcador de malignidad. Experimentos adicionales muestran que survivina regula la expresión de las isoformas de *p73* a través de la modificación de marcas epigenéticas relacionadas con la actividad transcripcional.

En resumen, los datos obtenidos apoyan la función oncogénica de las isoformas $\Delta\text{TA}p73$ en distintas etapas del proceso tumorogénico y su posible valor como marcadores moleculares de la evolución de los pacientes con cáncer de colon en el ámbito clínico. Finalmente distintos mecanismos y componentes podrían utilizarse para modular sus niveles en los pacientes, con el fin de afectar al pronóstico de los mismos.

SUMMARY

Colon and breast cancers are two of the most common neoplasias in Western societies, and associate with high mortality rates. In this context, the identification of molecular markers that can help to early detection or to predict the tumor's behavior and its response to therapy is very important. Therefore, the clinical significance of upregulation of *p73* variants in these tumor types is of particular interest, as well as their regulation and involvement in the different steps of the tumorigenesis process.

Although the *p73* isoforms bearing the transactivation domain, *TAp73*, show tumor suppressor functions, as p53 (another member of this family), the isoforms that lack it, Δ *TAp73*, exert an oncogenic effect through the repression of the suppressor properties of *TAp73* and p53. Furthermore, it has been described that all Δ *TAp73* variants induce the in vitro phosphorylation of the retinoblastoma tumor suppressor protein (pRB), which leads to the release of E2F. It is interesting that E2F-1 can activate *p73* transcription through its binding sites, which are located in non-coding regions of the two *p73* promoters. It has been also reported that Δ *Np73* promotes immortalization in primary cells and cooperates with oncogenic K-ras in the induction of in vivo cellular transformation. With all this information we try to characterize the expression profile of these genes in human tumors in order to elucidate its possible role in human carcinogenesis. The observed overexpression of *p73* isoforms in tumor tissues and its association with poor prognosis parameters robustly support its involvement in breast and colon tumorigenesis. The correlation found between *p73* variants, p53 and *E2F-1* in vivo indicate the existence of a functional network among them that could modulate the cellular suppressor or oncogenic context.

Our initial series of colon cancer patients was followed up an average of 70 months in order to evaluate the impact of *p73* isoform levels on patient disease-free and overall survival. Additionally, we evaluated the association between the expression of *p73* isoforms' target genes related to chemo-resistance processes (*MDR1*, *HMG-1* and *caspase-1*) and patients' outcome. The fact that overexpression of Δ *Ex2/3p73* and Δ *Np73* is associated with shorter overall survival indicates its putative value as prognosis markers, as well as supports their oncogenic role. The correlation between Δ *TAp73* variants and *HMG1* and *MDR1* suggest that the latter could be *p73* isoforms' targets in vivo. Furthermore, *HMG1* and *MDR1* independently predict the overall survival as strong as tumoral stage, what remarks the importance of identifying *p73* targets that could predict patients' outcome even better than Δ *TAp73* themselves.

The *p73* isoforms could also modulate the angiogenic process. There are contradictory data in the literature on this topic. Different studies support both the negative and positive regulation of *VEGF* by *p73*. In order to clarify whether the different isoforms of *p73* exert opposite effects on *VEGF* expression we perform a correlative analysis in our patients' samples. We also evaluated whether *VEGF*_{165b} and *PEDF*, both with anti-angiogenic functions, could be differentially regulated by *p73* isoforms. Finally, we evaluated whether some oncogenic alterations, as p53 mutations, *K-ras* activation and *E2F-1* levels could affect this pathway. We have observed a direct correlation between the expression levels of *p73* isoforms and *VEGF* and *VEGF*_{165b} and inverse with *PEDF*, what support its putative regulation by *p73* variants. This scenario becomes complicated due to a plausible feed-back mechanism between *PEDF* and *VEGF*. Our data support that *VEGF* could modulate *E2F-1* levels, and/or vice-versa. While *K-ras* mutations could negatively regulate *PEDF* expression, *VEGF*_{165b} overexpression could be a compensatory mechanism for p53 inactivation. Our results

sustain a tumor suppressor role for *VEGF_{165b}* and its putative value as a prognosis marker.

Due to the relevance that *p73* isoforms levels can exert on cancer patients' outcome, it is importance to identify mechanisms or components that can regulate their levels. In our study we observed that 1,25(OH)₂D₃, negatively regulate the expression of survivin and *p73* variants in colon and breast tumor cell lines. Additionally, we have observed a positive regulation of all *p73* isoforms by survivin. Thus, our data show that 1,25(OH)₂D₃ negatively regulate the different *p73* isoforms, and that this modulation could be survivin-dependent. We cannot rule out a direct regulation of *p73* isoforms by 1,25(OH)₂D₃. The results analyzing the levels of *EPR1* (located at the same chromosome region of survivin but in the opposite sense) support the role of *EPR-1* as a putative natural antisense of survivin and its plausible role as a malignant marker. Additional experiments show that survivin regulate *p73* isoforms expression throught the modification of epigenetic marks related with transcriptional activity.

In summary, our data sustain the oncogenic potential of *ΔTAp73* isoforms at different steps of the tumorigenesis process and its putative value as molecular markers of colon cancer patients' outcome in the clinic. Finally different mechanisms and components can be used to modulate their levels in patients, in order to affect patients' outcome.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNc	Acido desoxirribonucleico complementario
ARN	Acido ribonucleico
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
LOH	Pérdida de heterozigosidad
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RT	Transcripción inversa
1,25(OH)₂D₃	1 α ,25-dihidroxitamina D ₃

INDICES

ABREVIATURAS	- 9 -
INDICES	- 11 -
INTRODUCCIÓN.....	- 16 -
1. EPIDEMIOLOGÍA Y ORIGEN DEL CÁNCER	- 17 -
1.1 El cáncer de colon	- 18 -
1.2 El cáncer de mama.....	- 20 -
2. CICLO CELULAR Y CÁNCER.....	- 22 -
3. LA FAMILIA p53.....	- 25 -
3.1. El gen p73.....	- 26 -
4. CÁNCER Y ANGIOGÉNESIS	- 32 -
4.1 Implicación de las isoformas de p73 en el proceso angiogénico en cáncer de colon.....	- 34 -
5. MECANISMOS REGULADORES DE LA EXPRESIÓN DE p73	- 35 -
5.1 Regulación de las isoformas de p73 por vitamina D y survivina.....	- 35 -
6. IMPLICACIÓN DE LAS ISOFORMAS DE p73 EN PROCESOS DE QUÍMIO-RESISTENCIA	- 38 -
7. CONSIDERACIONES FINALES/HIPÓTESIS.....	- 40 -
7.1. Análisis del perfil de expresión de las distintas isoformas de p73 en cáncer de colon y mama.....	- 40 -
7.2. Implicación de las isoformas de p73 en el proceso angiogénico en cáncer de colon.....	- 41 -
7.3. Mecanismos reguladores de la expresión de p73	- 41 -
7.4. Implicación de las isoformas de p73 en procesos de químio-resistencia.....	- 43 -
OBJETIVOS	- 44 -
1. ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE LAS DISTINTAS ISOFORMAS DE p73 EN CÁNCER DE COLON Y MAMA	- 45 -
2. IMPLICACIÓN DE LAS ISOFORMAS DE p73 EN EL PROCESO ANGIOGÉNICO EN CÁNCER DE COLON	- 45 -
3. MECANISMOS REGULADORES DE LA EXPRESIÓN DE p73.....	- 45 -
4. IMPLICACIÓN DE LAS ISOFORMAS DE p73 EN PROCESOS DE QUÍMIO-RESISTENCIA	- 46 -
MATERIALES Y MÉTODOS.....	- 47 -
1. PACIENTES Y MUESTRAS	- 48 -
1.1 Características clínico-patológicas de los pacientes.....	- 49 -
2. CULTIVOS CELULARES	- 52 -
3. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	- 53 -
3.1 Extracción de ARN de tejidos y líneas celulares.....	- 53 -
3.2 Extracción de ADN de tejidos.....	- 53 -
3.3 Cuantificación de las extracciones	- 54 -
4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	- 55 -
4.1 Análisis mutacional del gen K-ras	- 55 -
5. TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT).....	- 57 -
6. CUANTIFICACIÓN A TIEMPO REAL	- 58 -
6.1 Cuantificación relativa a tiempo real con estándar externo.....	- 59 -
6.2. Procedimiento	- 59 -
7. TRATAMIENTO CON VITAMINA D.....	- 63 -
8. TRANSFECCIONES TRANSITORIAS.....	- 64 -
9. INMUNOHISTOQUÍMICA DE p53, VEGF Y VEGF ₁₆₅ B.....	- 65 -
10. EXTRACCIÓN PROTEICA. INMUNOTRASFERENCIA	- 67 -
11. ENSAYO DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA	- 69 -
11.1 Análisis del ADN inmunoprecipitado.....	- 71 -
12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	- 72 -
RESULTADOS.....	- 73 -
1. ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE LAS DISTINTAS ISOFORMAS DE p73 EN CÁNCER DE COLON Y CÁNCER DE MAMA.....	- 74 -
1.1 Coexpresión de las isoformas de p73 en tumores de colon y mama.....	- 74 -
1.2 Asociación entre el estatus de p53 y p73	- 75 -

1.3 Cooperación de las isoformas de p73 y K-ras oncogénico en tumorigénesis	- 76 -
1.4 Inducción de las isoformas de p73 por E2F-1	- 76 -
1.5 Asociación de la expresión de las distintas isoformas de p73 con los datos patológicos de los tumores de colon.....	- 77 -
1.6 Asociación de la expresión de las distintas isoformas de p73 con los datos patológicos de los carcinomas de mama	- 81 -
2. IMPLICACIÓN DE LAS ISOFORMAS DE P73 EN EL PROCESO ANGIOGÉNICO EN CÁNCER DE COLON	- 83 -
2.1 Correlación entre los niveles de expresión de VEGF, VEGF _{165b} , PEDF y las isoformas de p73	- 83 -
2.2 La expresión proteica de VEGF y VEGF _{165b} . Correlación con los niveles de ARNm	- 85 -
2.3 Correlación entre los niveles de expresión de VEGF y PEDF	- 87 -
2.4. Asociación entre eventos moleculares implicados en transformación celular y los niveles de expresión de VEGF, VEGF _{165b} y PEDF	- 88 -
2.5 Asociación entre los niveles de ARNm de VEGF y los parámetros patológicos de los carcinomas de colon	- 89 -
2.6 Asociación entre los niveles de expresión de VEGF _{165b} y las características patológicas de los carcinomas de colon.....	- 89 -
2.7 Asociación entre los niveles de expresión de PEDF y las características patológicas de los tumores	- 90 -
2.8 Inducción de E2F-1 por VEGF	- 91 -
3. MECANISMOS REGULADORES DE LA EXPRESIÓN DE P73.....	- 92 -
3.1 La forma activa de la vitamina D, 1,25(OH) ₂ D ₃ , disminuye la expresión de survivina y de las isoformas de p73 en células tumorales de colon y mama	- 92 -
3.2 Survivina induce la expresión de las isoformas de p73 en células tumorales humanas	- 93 -
3.3 Correlación entre los niveles de las variantes de p73, survivina y VDR en pacientes de cáncer de colon y mama	- 94 -
3.4 Correlación entre los niveles de survivina y de EPR1.....	- 95 -
3.5 Correlación entre los niveles de expresión de survivina y EPR1 con los parámetros clínico-patológicos de los tumores.....	- 96 -
3.6 Survivina induce modificaciones epigenéticas en el promotor de p73	- 99 -
4. IMPLICACIÓN DE LAS ISOFORMAS DE P73 EN PROCESOS DE QUÍMIO-RESISTENCIA	- 102 -
4.1 Correlación entre la expresión de las isoformas de p73 y sus genes diana con el pronóstico de los pacientes con cáncer de colon.....	- 102 -
4.1.1 Asociación con la supervivencia libre de enfermedad	- 102 -
4.1.2 Asociación con la supervivencia global.....	- 102 -
4.2 Correlación entre la expresión de las isoformas de p73 y los niveles de ARNm de genes diana de p73 relacionados con resistencia a drogas.....	- 103 -
4.3 Correlación entre los genes diana de p73 relacionados con resistencia a drogas y el pronóstico de los pacientes.....	- 104 -
4.3.1 Correlación con la supervivencia libre de enfermedad	- 104 -
4.3.2 Correlación con la supervivencia global.....	- 104 -
DISCUSIÓN.....	- 108 -
1. ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE LAS DISTINTAS ISOFORMAS DE P73 EN CÁNCER DE COLON Y MAMA.....	- 109 -
2. IMPLICACIÓN DE LAS ISOFORMAS DE P73 EN EL PROCESO ANGIOGÉNICO EN CÁNCER DE COLON	- 115 -
3. MECANISMOS REGULADORES DE LA EXPRESIÓN DE P73.....	- 118 -
4. IMPLICACIÓN DE LAS ISOFORMAS DE P73 EN PROCESOS DE QUÍMIO-RESISTENCIA	- 122 -
CONCLUSIONES.....	- 124 -
BIBLIOGRAFÍA.....	- 127 -
ANEXO	- 143 -

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del ciclo celular.....	- 23 -
Figura 2. Esquema de la familia <i>p53</i>	- 25 -
Figura 3. Esquema del gen <i>p73</i> y sus isoformas.....	- 30 -
Figura 4. Hipótesis de la regulación de las isoformas de <i>p73</i> por vitamina D y survivina.....	- 41 -
Figura 5. Fases de la PCR.....	- 57 -
Figura 6. Asociación de los niveles de expresión de las variantes $\Delta Ex2/3p73$ y $\Delta Np73$ con el estadio tumoral de los pacientes con cáncer de colon.....	- 79 -
Figura 7. Niveles de expresión de <i>VEGF total</i> , <i>VEGF</i> , <i>VEGF_{165b}</i> , <i>PEDF</i> , las isoformas de <i>p73</i> y <i>E2F-1</i>	- 83 -
Figura 8. Correlaciones entre la expresión de <i>VEGF</i> y <i>VEGF_{165b}</i> y las isoformas de <i>p73</i> en pacientes con cáncer de colon.....	- 84 -
Figura 9. Inmunohistoquímica de <i>VEGF</i> y <i>VEGF_{165b}</i>	- 85 -
Figura 10. Correlación entre los niveles de <i>VEGF</i> y <i>PEDF</i> y las isoformas de <i>p73</i>	- 86 -
Figura 11. Asociación entre la expresión de <i>VEGF_{165b}</i> y <i>PEDF</i> y distintos eventos oncogénicos.....	- 87 -
Figura 12. Asociación entre los niveles de <i>VEGF_{165b}</i> y parámetros clínicos.....	- 89 -
Figura 13. Efectos del tratamiento con vitamina D sobre los niveles de survivina y las isoformas de <i>p73</i>	- 92 -
Figura 14. Incremento de los niveles de <i>p73</i> en distintas líneas celulares debido a la expresión ectópica de <i>survivina</i>	- 93 -
Figura 15. Correlaciones entre la expresión de <i>survivina</i> y las isoformas de <i>p73</i> en pacientes con cáncer de colon y de mama.....	- 94 -
Figura 16. Mediana de niveles de <i>EPR1</i> y expresión proteica de survivina en líneas celulares y paciente con cáncer colon.....	- 95 -
Figura 17. Cambios epigenéticos de la líneas de cáncer de colon SW480-ADH en los dos promotores de <i>p73</i>	- 99 -
Figura 18. Cambios epigenéticos de la líneas de cáncer de mama MDA-MB-453 en el promotor de <i>p73</i>	- 100 -
Figura 19. Curvas de Kaplan-Meier de la supervivencia global en pacientes con cáncer de colon respecto de los niveles de las isoformas $\Delta Ex2/3p73$ y $\Delta Np73$	- 102 -
Figura 20. Curvas de Kaplan-Meier de la supervivencia global en pacientes con cáncer de colon respecto de los niveles de <i>MDR1</i>	- 104 -
Figura 21. Curvas de Kaplan-Meier de la supervivencia global en pacientes con cáncer de colon respecto de los niveles de <i>HMG1</i>	- 105 -

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de la serie de pacientes con cáncer de mama y de colon.....	- 50 -
Tabla 2. Secuencias de los cebadores usados en el estudio cuantitativo.....	- 61 -
Tabla 3. Secuencia de los cebadores usados para el estudio de los promotores.....	- 70 -
Tabla 4. Descripción de los niveles de expresión de las isoformas de <i>p73</i> y <i>E2F-1</i> en las muestras de cáncer de colon y de mama.....	- 73 -
Tabla 5. Correlaciones entre los niveles de las isoformas de <i>p73</i> y <i>E2F-1</i> en los casos analizados de cáncer de mama y de colon.....	- 74 -
Tabla 6. Asociaciones entre la expresión de las isoformas de <i>p73</i> y las características clínico-patológicas de los pacientes con cáncer de colon.....	- 78 -
Tabla 7. Asociaciones entre la expresión de las isoformas de <i>p73</i> y las características clínico-patológicas de los pacientes con cáncer de mama.....	- 81 -
Tabla 8. Descripción de los niveles de expresión de <i>VEGF</i> , <i>VEGF_{165b}</i> y <i>PEDF</i> en las muestras de cáncer de colon.....	- 82 -
Tabla 9. Correlaciones entre los niveles de <i>VEGF</i> , <i>VEGF_{165b}</i> y <i>PEDF</i> y <i>E2F-1</i> en los casos de cáncer de colon.....	- 83 -
Tabla 10. Asociación de los niveles de expresión de <i>survivin</i> y <i>EPR-1</i> con las características clínico-patológicas de los pacientes con cánceres de colon y de mama.....	- 96 -
Tabla 11. Correlaciones entre los niveles de expresión de las isoformas de <i>p73</i> y <i>HMG1</i> , <i>MDR1</i> y <i>caspasa-1</i>	- 102 -
Tabla 12. Análisis univariante y multivariante de los niveles de expresión de las isoformas de <i>p73</i> , <i>MDR1</i> , <i>HMG1</i> y <i>caspasa-1</i> y los parámetros de los pacientes con respecto a la supervivencia global.....	- 106 -

INTRODUCCIÓN

1. EPIDEMIOLOGÍA Y ORIGEN DEL CÁNCER

El cáncer es un problema importante de la salud pública mundial. Constituye la segunda causa de mortalidad en países desarrollados, por detrás de las enfermedades cardiovasculares, lo que supuso un 13% de la mortalidad mundial (7.9 millones de muertes) en 2007. Más de 11 millones de personas son diagnosticadas al año, de los que solo la mitad sobrevivirán más de cinco años. Se estima que las muertes por cáncer en el mundo continuarán aumentando, con una estimación de 12 millones de muertes en 2030 (<http://www.who.int/cancer/en>).

En la Unión Europea hubo 1.122.000 defunciones en el año 2000 debidas a esta enfermedad (Quinn, d'Onofrio et al. 2003). En España en el año 2006 el cáncer produjo más de 98.000 muertes, 61.000 en hombres y 37.000 en mujeres. Los tumores malignos han sido la segunda causa de muerte en España en las últimas décadas, solamente superados por las enfermedades del aparato circulatorio, pero desde el año 2005, los tumores son la primera causa de muerte en los hombres y se mantienen en un segundo lugar en las mujeres (www.cne.isciii.es).

El aumento de la incidencia del cáncer va en paralelo con el incremento de la esperanza de vida media de la población, y actualmente está epidemiológicamente aceptado que la edad es el principal factor de riesgo para desarrollar un cáncer (Muñoz 1997).

En general, las causas que desencadenan un proceso cancerígeno se pueden agrupar en endógenas (genes, hormonas) y exógenas (tabaco, alcohol, dieta, radiaciones, factores ocupacionales, virus y fármacos).

El cáncer es una enfermedad heterogénea y genética, cuya característica principal es la desregulación del ciclo celular, que da lugar al crecimiento excesivo y descontrolado de las células tumorales que invaden y dañan tejidos y órganos (Muñoz 1997). La biología molecular está aportando información sobre su origen, proliferación y extensión, así como el conocimiento de las vías implicadas en resistencia a los tratamientos actuales. Con esta información se han podido identificar nuevas dianas del tumor y de su vascularización lo que ha permitido el desarrollar de nuevas terapias alternativas.

En una célula cancerosa la acumulación de alteraciones en los genes que controlan la proliferación, conduce a la división desordenada de ésta, dando lugar a un clon celular que se divide de forma continua y autónoma, que conforma el tumor

primario. Dentro de este clon, aquellas células que adquieran alteraciones que les proporcionen ventajas en el crecimiento, serán seleccionadas mayoritariamente en el tumor. A lo largo de sucesivas divisiones algunas de estas células adquirirán la capacidad invasiva que les permitirá escapar de su localización natural en el organismo y colonizar otros tejidos u órganos (metástasis)(Knudson 1997).

Por ahora, el diagnóstico precoz sigue siendo la mejor herramienta de lucha contra el cáncer. Esta detección precoz del tumor se basa fundamentalmente en métodos clínicos y/o de imagen que proporcionan el tamaño tumoral, pero ningún indicio de la biología y del comportamiento tumoral. Se espera que con los estudios moleculares se avance en este sentido, y se puede diagnosticar aun antes de que existan signos clínicos o lesión demostrable. En caso, que ya existiera la lesión, se espera que estos estudios moleculares nos dieran una orientación correcta a la hora de elegir un tratamiento eficaz.

1.1 El cáncer de colon

El cáncer de colon causó el 12% de las defunciones por cáncer en hombres y el 15% en mujeres en el 2006 (www.cne.isciii.es). En España se estima la tasa de aparición de 99 nuevos casos al año por cada 100.000 habitantes (www.cne.isciii.es). La mortalidad es muy elevada, constituyendo la segunda localización tumoral en importancia en hombres y en mujeres (www.cne.isciii.es). Su etiología se desconoce, aunque se cree que es multifactorial dependiendo de la predisposición genética y factores ambientales como los hábitos dietéticos y el estilo de vida, que explicaría su elevado número en países desarrollados y su menor frecuencia en África y Asia (Troisi, Freedman et al. 1999).

A pesar de que se han detectado distintos factores de riesgo, cabe destacar que la mayoría de los casos, aproximadamente el 75% de los cánceres de colon, aparecen en individuos sin factores de predisposición conocidos, es decir, son casos esporádicos. En el restante 25% existen antecedentes familiares, de los cuales sólo un 10% se relaciona con algún componente genético, el otro 15% sugiere un componente hereditario de contribución genética, exposición a un agente potencialmente cancerígeno de los miembros de la familia o ambas cosas (Salovaara, Loukola et al. 2000).

De los cánceres de colon con antecedentes familiares, destacan varios síndromes hereditarios (Kinzler and Vogelstein 1996; Lynch and Hoops 2002) que comprenden mayoritariamente 2 formas bien caracterizadas: la poliposis adenomatosa familiar, FAP

(Familial Adenomatous Polyposis), caracterizada por alteraciones genéticas del gen *APC* (Adenomatous Polyposis Coli), que está implicado en procesos de adhesión celular, fosforilación de la proteína del retinoblastoma (regulación ciclo celular) y muerte por apoptosis; (Kinzler, Nilbert et al. 1991; Spirio, Olschwang et al. 1993), y el cáncer de colon hereditario de tipo no polipósico, HNPCC (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer), caracterizado por mutaciones germinales en los genes de reparación del ADN de la vía mismatch. Se estima que cuando estos genes no funcionan correctamente, se produce una acumulación de mutaciones durante el proceso de replicación, lo que conduce a un incremento significativo de mutaciones en todo el genoma, pudiendo afectar a genes que regulan el ciclo celular (Leach, Nicolaides et al. 1993; Nicolaides, Papadopoulos et al. 1994; Papadopoulos, Nicolaides et al. 1994; Miyaki, Nishio et al. 1997). Otro síndrome es el cáncer de colon familiar, FCC (Familial Colorectal Cancer), con la existencia de familias con una clara agregación de adenomas o cáncer de colon, pero sin un factor genético conocido (Fuchs, Giovannucci et al. 1994).

Un dato también importante, es que los factores hereditarios además de influenciar la aparición del cáncer de colon, influyen en la edad de aparición. De tal manera que un individuo que presenta algún familiar de primer grado con cáncer de colon la edad de aparición de su cáncer se reducirá en aproximadamente diez años menos de la media de aparición de los casos esporádicos (Fuchs y col, 1994).

Como ya se ha comentado la mayoría de los pacientes con cánceres de colon no presentan estos antecedentes familiares, sin embargo al analizar sus tumores se observan las mismas alteraciones moleculares que en los pacientes con cánceres hereditarios.

De entre los factores ambientales de riesgo descritos destacan el mayor consumo de carne y grasas animales y menor consumo de fibra. Se han referido como factores protectores el consumo de vegetales, fruta, fibra, calcio y aspirina (Winawer, St John et al. 1990). También el consumo de alcohol como posible factor de riesgo y en concreto el consumo de cerveza (Sharpe, Siemiatycki et al. 2002).

En estos tumores, los datos de mortalidad no reflejan la verdadera incidencia de la enfermedad, ya que la supervivencia ha mejorado en los últimos años, principalmente en personas jóvenes. La tendencia reciente al descenso de la mortalidad puede reflejar las mejoras terapéuticas obtenidas con un diagnóstico precoz, por tratarse de tumores

bastante accesibles a la exploración con sigmoidoscopio y a la generalización de las colonoscopías completas en grupos de riesgo identificados (www.cne.isciii.es).

Las nuevas técnicas de inmunohistoquímica y biología molecular permiten profundizar en el conocimiento del fenotipo y del genotipo de estas neoplasias, y su correlación con la evolución biológica. La utilización de estas técnicas abre la posibilidad de identificar otros factores pronósticos de marcado carácter molecular.

1.2 El cáncer de mama

El cáncer de mama es el tumor maligno más frecuente en mujeres y supone más del 25% de todos los cánceres femeninos. Tiene una alta prevalencia y se estima que alrededor del 10% de las mujeres pueden desarrollar un cáncer de mama a lo largo de su vida. En España, la tasa de aparición se estima en unos 93,50 casos nuevos diagnosticados cada año por cada 100.000 mujeres. Su incidencia continua aumentando, principalmente en mujeres de menos de 35 años, pero, por el contrario, se ha conseguido disminuir la mortalidad y prolongar la supervivencia global (el 71% a los 5 años) debido a la mayor efectividad de los tratamientos disponibles y a la mejora de las técnicas de cribaje y diagnóstico (www.cne.isciii.es). A pesar de este gran avance en la lucha contra el cáncer de mama, en España en el 2006 murieron por cáncer de mama 5.939 mujeres lo que representa el 16% de las muertes por cáncer en mujeres en nuestro país (www.cne.isciii.es).

De entre los factores de riesgo para el desarrollo del cáncer de mama destaca su influencia hormonal, ya que muchos de los factores establecidos -menarquía temprana, menopausia tardía, nuliparidad, edad tardía del primer parto y obesidad en mujeres posmenopáusicas- suponen una mayor exposición a estrógenos. Otros factores de riesgo investigados en la literatura incluyen el sedentarismo, la exposición precoz a altas dosis de radiaciones ionizantes, el consumo de alcohol, los anticonceptivos orales, el alto consumo de grasa, el menor consumo de folatos, el tabaco y los campos electromagnéticos de muy baja frecuencia (www.cne.isciii.es).

En el cáncer de mama es muy importante resaltar la predisposición familiar, que puede llegar a más del 10% en las mujeres que lo desarrollan antes de los 45 años. Aproximadamente la mitad de estos cánceres que poseen algún tipo de factor genético hereditario parecen estar relacionados con una herencia mendeliana simple de transmisión autosómica dominante de, al menos, dos genes mayores de predisposición

con fuerte penetrancia para el cáncer de mama. Estos dos genes son *BRCA1* y *BRCA2*. Estudios de ligamiento en familias con múltiples miembros con cáncer de mama y/u ovario, sugieren que sus mutaciones están relacionadas con el 45% y el 35%, respectivamente, de los casos hereditarios de este tipo de tumores en la población de América del Norte y Europa Occidental (Schubert, Lee et al. 1997). De cualquier forma, estos porcentajes son muy variables y dependen de la selección de los tipos de familias estudiadas.

Existen otros genes que confieren alto riesgo de padecer cáncer de mama junto a otras patologías o cánceres. Como por ejemplo, las mutaciones germinales en el gen *p53*, localizado en el brazo corto del cromosoma 17p13.1, en familias con síndrome de Li-Fraumeni. Los miembros de estas familias pueden padecer varios tipos de cánceres, entre los que se incluye el de mama (Li and Fraumeni 1969; Hartmann, Blaszyk et al. 1997). También, se han encontrado mutaciones en *p53* en enfermas con cáncer de mama que presentaban alteraciones germinales en los genes *BRCA1* o *BRCA2* (Crook, Crossland et al. 1997), (Schlichtholz, Bouchind'homme et al. 1998). En otros estudios, mujeres portadoras de un solo alelo mutado del gen de la ataxia telangiectasia, *AT*, padecen cáncer con una frecuencia 100 veces superior a la población general y presentan un riesgo aproximadamente 5 veces mayor para el cáncer de mama (Savitsky, Bar-Shira et al. 1995). Este riesgo lo confiere su alta sensibilidad a radiaciones ionizantes (Swift 1994). Alteraciones en el proto-oncogén *H-ras1* se asocian también a cáncer de mama y ovario (Phelan, Rebbeck et al. 1996). Además mutaciones en el gen *PTEN/MMAC1* en familias con el síndrome de Cowden, confiere a las mujeres de estas familias un riesgo de 30-50% de padecer cáncer de mama a lo largo de su vida. Se estima que este gen se encuentra mutado, aproximadamente en un 4% de los cánceres de mama (Liaw, Marsh et al. 1997). Se sospecha que deben existir otros genes responsables del desarrollo de los cánceres de mama y ovario, que expliquen el resto de los casos familiares que no están ligados ni a *BRCA1* ni a *BRCA2*, y que tampoco se explican con las escasas mutaciones en línea germinal en los genes mencionados.

A pesar de todos estos estudios, la gran mayoría de los cánceres de mama (90-95%), no tienen un componente hereditario, y se deben a mutaciones adquiridas de forma espontánea a lo largo de la vida (Andersen 1996; Stratton and Wooster 1996), no conociéndose claramente, la implicación de estos genes en el desarrollo de los casos esporádicos.

2. CICLO CELULAR Y CÁNCER

Las células que se dividen pasan a través de una secuencia regular de crecimiento y división celular, conocida como ciclo celular (Muñoz 1997). El ciclo celular está formado por dos fases principales: interfase y mitosis (M) (Figura 1). Las células que no se están dividiendo están en una fase conocida como G₀. Antes de que una célula pueda comenzar la mitosis y dividirse efectivamente, debe duplicar su ADN, sintetizar mayor cantidad de histonas y otras proteínas asociadas al ADN, producir una reserva adecuada de orgánulos para las dos células hijas, y ensamblar las estructuras necesarias para que se lleve a cabo la mitosis. Estos procesos preparatorios comprendidos entre dos divisiones, ocupando casi el 95% del ciclo, ocurren durante el periodo de interfase del ciclo celular, el cual comprende tres etapas: G₁, S y G₂.

La fase G₁, periodo que transcurre inmediatamente posterior a una división celular hasta el inicio de la síntesis de ADN, es un período de actividad bioquímica intensa. En esta fase, la célula aumenta su tamaño, y sus enzimas, y orgánulos celulares, así como otras moléculas y estructuras citoplasmáticas también aumentan en número. En la fase S se produce el proceso clave de replicación del material genético. Muchas histonas y otras proteínas asociadas al ADN son también sintetizadas. Como resultado cada cromosoma se duplica y queda formado por dos cromátidas idénticas. La fase G₂ comprende el periodo entre la fase final de síntesis y el inicio de la división. Los cromosomas recién duplicados comienzan a condensarse en una forma compacta. Durante este período la célula comienza a ensamblar las estructuras especiales requeridas para asignar un conjunto completo de cromosomas a cada célula hija y para dividir citoplasma y membrana celular durante el proceso denominado citocinesis. Durante la mitosis los cromosomas terminan de condensarse, los microtúbulos del citoesqueleto se desarticulan, la envoltura nuclear se rompe y las fibras del huso y cinetocoro se forman. Se separan las cromátidas de cada par formando dos conjuntos idénticos de cromosomas cada uno en un polo celular, volviéndose a formar sendas envolturas nucleares.

En todas las fases existen puntos de control encargados de regular el paso a la siguiente fase. En la fase G₁ existe el punto de restricción R en el cual la célula comprueba que no hay alteraciones en el ADN para seguir adelante en el ciclo; en la fase G₂ existe el punto de control G₂-M donde la célula ha de asegurarse que ha completado la replicación del ADN una única vez y que ha duplicado su masa

correctamente de modo que pueda dar lugar a dos células hijas; y por último, el punto de control M, en el cual la célula verifica que todos los cromosomas se encuentran alineados en el huso acromático (Muñoz 1997). Si ocurriesen fallos en alguno de estos puntos de control, el ciclo celular podría acelerarse dando lugar a una proliferación descontrolada de las células.

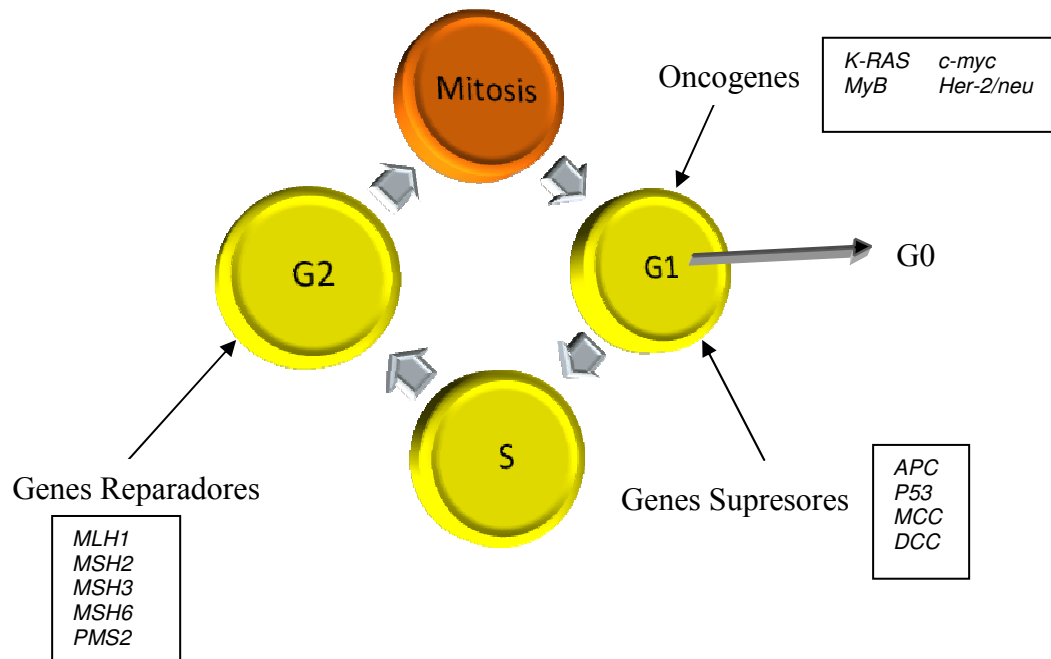
Diferentes causas pueden desencadenar el desarrollo de un tumor, pero todas ellas tienen en común la acumulación de mutaciones, ya sean somáticas o germinales, sobre un sustrato común dentro de la célula que engloba a los genes reguladores del inicio, progresión, integridad y fin del ciclo celular. Estos genes se pueden dividir en dos grupos: **oncogenes y genes supresores**. Cada uno de estos tipos de genes tiene su papel principal en alguna de las fases del ciclo celular (Figura 1).

Los **proto-oncogenes** actúan como aceleradores del crecimiento mayoritariamente durante la fase G1. Codifican un grupo de proteínas que intervienen en las señales de transducción (transmisión de información desde la membrana plasmática al núcleo) o en la regulación de la expresión génica (Gruber, Petersen et al. 1999). Cuando se producen alteraciones genéticas como mutaciones, amplificaciones génicas o translocaciones, que provocan su expresión de forma excesiva, pasando entonces a denominarse **oncogenes**, se conduce a la desregulación de procesos como la proliferación celular o la apoptosis. La sobreexpresión de los oncogenes, que puede ser dada con un solo alelo alterado, estimula el crecimiento, la invasividad y la transformación celular, pudiendo generar un tumor.

El segundo grupo lo forman los **genes supresores**, los cuales actúan principalmente antes de la entrada en la fase S y su función normal es la inhibición del ciclo celular. Al contrario que en los oncogenes, se necesita su inactivación para favorecer la aparición y desarrollo del tumor (Carson, Santoro et al. 2004). Esta inactivación puede ser debida a una pérdida de expresión ó a la expresión de una proteína no funcional. Para que exista una pérdida de función es necesario que los dos alelos del gen se encuentren inactivos. Según la teoría de Knudson (Knudson 1985), una primera mutación en un alelo adquirida por vía germinal o bien somáticamente produciría la inactivación de un alelo, mientras que el segundo sería inactivado por alguna otra alteración genética, como pérdidas de heterozigosidad o alguna alteración epigenética como la metilación de los promotores génicos. Dentro de ellos se encuentran los **genes reparadores**, los cuales actúan en fase G2 justo antes de la condensación de los cromosomas para entrar en la fase de mitosis. Son los responsables

de la reparación de los errores en la cadena de ADN producidos durante la replicación o inducidos por agentes físicos, químicos o biológicos, manteniendo así la integridad genómica.

Figura 1. Esquema del ciclo celular



3. LA FAMILIA *p53*

La familia del gen *p53* está compuesta por tres miembros *p53* (17p13.1), *p63* (3q28) y *p73* (1p36.32). *p53* fue el primer miembro descrito hace más de 30 años, y por tanto el mejor conocido. *p53* es una proteína supresora tumoral que integra distintas señales de estrés y las trasmite a través de un largo número de efectores incluyendo aquellos implicados en regulación del ciclo celular e inducción de apoptosis, senescencia celular, autofagia, diferenciación y reparación de daño genotóxico (Yu 2006; Maddika, Ande et al. 2007), contribuyendo así al mantenimiento de la estabilidad genómica. *p63* y *p73* comparten una considerable similitud estructural y funcional con *p53* y exhiben también propiedades únicas. Ambas proteínas *p63* y *p73* pueden significativamente afectar la actividad de *p53*.

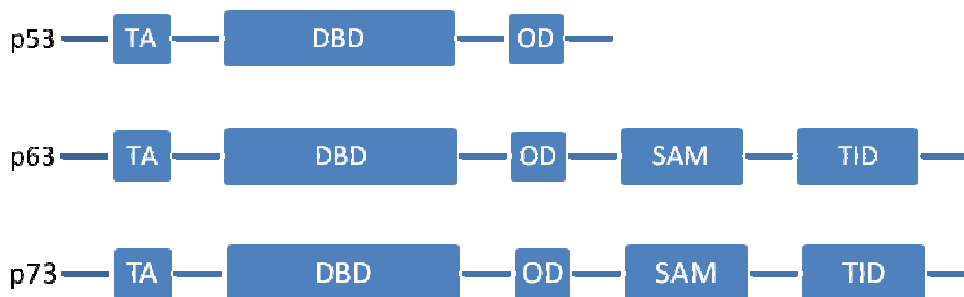
La estructura génica de los genes *p53*, *p63* y *p73* está muy conservada evolutivamente, desde los moluscos hasta el ser humano (Ou, Lohr et al. 2007), lo que indica su importancia. Los dominios más conservados en los tres genes son: el dominio de transactivación (TAD) situado en la región amino terminal, el dominio de unión al ADN (DBD) que se localiza en la región central y el dominio de oligomerización (OD) que se encuentra en la región carboxilo terminal (Melino, Lu et al. 2003) (Figura 2). Además *p63* y *p73* presentan una región carboxilo terminal más extensa ausente en *p53*. Dentro de esta región carboxilo terminal existe un motivo de interacción de proteína-proteína de tipo SAM (sterile alpha motif) previamente encontrado en otras proteínas que regulan el desarrollo y un dominio inhibitorio de la transcripción (TID) (Melino, Lu et al. 2003) (Figura 2). Además se ha descrito otro posible dominio de transactivación en la región carboxilo terminal (Nyman, Vlachos et al. 2009). El mayor nivel de homología se alcanza en el DBD (con un 63% de homología entre *p53* y *p73*, y un 60% entre *p53* y *p63*), lo que sugiere que las tres proteínas codificadas por estos genes pueden unirse a las mismas secuencias diana de ADN y promover la transcripción de los mismos genes (transactivar). La conservación de este dominio a lo largo de la evolución apoya que la regulación de la transcripción juega un papel importante en las amplias funciones atribuidas a la familia *p53*.

Las mutaciones en *p53* son el evento génico más frecuente en cánceres humanos (Vogelstein, Lane et al. 2000). De hecho, su inactivación está fuertemente asociada a un aumento de susceptibilidad a formar tumores tanto en animales de laboratorio como en humanos (Donehower, Harvey et al. 1992). Además su alteración

en línea germinal multiplica el riesgo de desarrollar cáncer (Vogelstein, Lane et al. 2000)

Los tres genes de la familia *p53* dan lugar a un extenso número de transcritos consecuencia del procesamiento alternativo del ARN mensajero y/o del uso alternativo de dos promotores (P1 y P2).

Figura 2. Esquema de la familia *p53*.



3.1. El gen *p73*

Inicialmente, el hecho de que la región cromosómica que alberga a este gen presentara frecuentemente pérdida de heterozigosidad en distintos tipos tumorales, junto con su similitud funcional y estructural con *p53*, llevó a pensar en su papel como supresor de tumores. Llamativamente, al contrario que para *p53*, las mutaciones inactivantes en *p73* eran muy raras, sin embargo se observó la sobreexpresión de la forma nativa en un porcentaje elevado de una gran variedad de tumores. Adicionalmente, algunos estudios mostraban asociación de esta sobreexpresión con parámetros clinicopatológicos de los tumores de peor pronóstico (Dominguez, Silva et al. 2001b; Sun 2002). Estos datos descartaban a *p73* como el clásico gen supresor tumoral descrito por Knudson. El ratón doble negativo para *p73* no aportó evidencias claras acerca de su papel en cáncer. Estos ratones presentaban defectos neurológicos, además de una pan-mucositis generalizada con consecuentes infecciones microbiológicas que les acortaban la vida, y lo más importante, no presentaban un aumento de susceptibilidad a desarrollar cáncer, quizás debido a su corta vida.

La observación posterior de que *p73* se transcribía a un complejo número de isoformas como consecuencia de un procesamiento alternativo del ARN mensajero o del uso de dos promotores distintos (Figura 3) aportó más información acerca de su función en tumorigénesis. Las variantes *TAp73* mantienen el dominio amino terminal de transactivación y son generadas a partir del primer promotor. Estos transcritos, al

menos cuando se sobreexpresan, pueden inhibir proliferación celular, promover diferenciación e inducir apoptosis, transactivando muchos de los genes diana de *p53*, actuando así como isoformas supresoras tumorales. Las isoformas $\Delta TAp73$ ($\Delta Ex2p73$, $\Delta Ex2/3p73$, $\Delta Np73$ y $\Delta N'p73$) pierden el dominio de transactivación y se les atribuye propiedades oncogénicas, ya que fallan en la inducción de parada del ciclo celular y apoptosis, presentando propiedades biológicas opuestas a *p53* y a las variantes *TAp73*. Las isoformas $\Delta Ex2p73$ y $\Delta Ex2/3p73$ pierden los exones 2 o 2 y 3, respectivamente, como resultado de un procesamiento alternativo en la región amino terminal. $\Delta Np73$ se genera a partir de un promotor alternativo localizado en el intrón 3 y contiene adicionalmente un nuevo exón, el denominado 3'. Se ha descrito que esta variante juega un papel anti-apoptótico esencial durante el desarrollo del cerebro del ratón. La variante $\Delta N'p73$ se genera a partir del primer promotor pero incluye aberrantemente 198pb del exón 3'. La traducción del transcrito $\Delta N'p73$ comienza en el exón 3' produciéndose una proteína indistinguible de la $\Delta Np73$. (Figura 3). Así el gen *p73* podría jugar un papel supresor tumoral u oncogénico dependiendo de sus isoformas específicas (Yang, Kaghad et al. 1998; Yang, Walker et al. 2000; Stiewe, Zimmermann et al. 2002; Sayan, Roperch et al. 2007). Adicionalmente, todas estas isoformas pueden sufrir el procesamiento alternativo del carboxilo terminal que implica específicamente a los exones del 10 al 13.

El análisis de los niveles de expresión de las distintas isoformas de *p73* ha evidenciado la asociación de su sobreexpresión en distintos tipos tumorales y parámetros clásicamente asociados a un peor pronóstico de los pacientes (Concin, Becker et al. 2004; Stiewe, Tuve et al. 2004; Uramoto, Sugio et al. 2004). Es llamativo que existen pocos estudios en la literatura evaluando su correlación con la supervivencia de los pacientes (Casciano, Mazzocco et al. 2002; Sun 2002; Uramoto, Sugio et al. 2004; Concin, Hofstetter et al. 2005; Muller, Schilling et al. 2005; Becker, Pancoska et al. 2006; Liu, Chan et al. 2006; Wager, Guilhot et al. 2006; Zitterbart, Zavrelova et al. 2007). Así, *p73* debe jugar un papel importante en el desarrollo de los tumores humanos. Sin embargo, el actual papel de *p73* en el proceso carcinogénico tiene un alto grado de complejidad, dadas las funciones diametralmente opuestas de los dos tipos de productos génicos expresados concomitantemente y a la red de interacciones entre los distintos miembros de la familia. Tanto *p53* como *TAp73* pueden inducir *in vitro* la expresión de $\Delta Np73$ activando su transcripción a partir del promotor secundario (P2) (Grob, Novak et al. 2001; Kartasheva, Contente et al. 2002; Nakagawa, Takahashi et al.

2002). Esto supone un mecanismo de retroalimentación negativa entre las distintas isoformas ya que $\Delta Np73$ puede regular negativamente a $p53$ y $TAp73$. Partiendo del hecho de que las isoformas $\Delta TAp73$ y $TAp73$ comparten el mismo dominio de unión al ADN y el mismo dominio de tetramerización, se han sugerido dos mecanismos no mutuamente excluyentes para su actuación como dominantes negativos de $p53$ y $TAp73$. Así las formas $\Delta TAp73$ competirían con las isoformas $TAp73$ y con $p53$ por los sitios de unión a los promotores de sus genes diana, bloqueando su transcripción eficiente. Además, las isoformas $\Delta TAp73$ podrían inhibir a las funciones de $TAp73$ y $p53$ a través de la formación de complejos hetero-oligoméricos transcripcionalmente inactivos (Nakagawa, Takahashi et al. 2002; Stiewe, Theseling et al. 2002; Zaika, Slade et al. 2002).

Las isoformas $\Delta TAp73$ pueden actuar como oncogenes no sólo inactivando las funciones de $TAp73$ y $p53$. Se ha descrito que la isoforma $\Delta Np73$ coopera con el oncogén *ras* en la promoción de tumorigénesis *in vivo*. Así $\Delta Np73$ puede ser clasificada como una proteína inmortalizante que coopera con un oncogén clásico en la inducción de transformación celular (Petrenko, Zaika et al. 2003). Además *ras* oncogénico puede modular el ratio $TAp73/\Delta Np73$ a favor de $\Delta Np73$, a través de la bajada de la isoforma $TAp73$, producida por la activación de la vía de la fosfatidilinositol quinasa-3 (PI3K) (Beitzinger, Hofmann et al. 2008). Además el hecho de que células que sobreexpresan $\Delta Np73$ promueven la formación tumoral al ser inyectadas en ratones desnudos apoyan esta función oncogénica (Petrenko, Zaika et al. 2003). Finalmente, datos recientes han descrito que $\Delta Np73$ ejerce su propio programa transcripcional que podría ser atribuible al dominio de transactivación adicional recientemente identificado, que consiste en 13 residuos únicos y motivos amino terminales PXXP (Kartasheva, Lenz-Bauer et al. 2003; Liu, Nozell et al. 2004; Tanaka, Kameoka et al. 2004; Vilgelm, Wei et al. 2008).

Se sabe que $TAp73$ actúa sinérgicamente con $p53$ después de daño genómico o de estrés oncogénico en células primarias, lo que supone un mecanismo doble de defensa contra la transformación neoplásica (Cai, Yang et al. 2000). Así algunas funciones atribuidas a $p53$ son compartidas por $TAp73$. Estas actividades incluyen inducción de la apoptosis, parada del ciclo celular y senescencia celular. Esta similitud puede ser explicada, al menos en parte, por la transactivación de un grupo común de genes dianas. $TAp73$ puede inducir la transcripción de genes clásicamente inducidos por $p53$ tales como *p21/Waf1*, *GADD45*, *14-3-3sigma*, *Bax*, *PUMA*, *NOXA*, *CD95/FAS*, *PIG3* y *p53AIP1* (Harms, Nozell et al. 2004). Varios estudios han confirmado este

solapamiento de los perfiles de transcripción de p53 y p73, aunque también se identificaron dianas únicas (Fontemaggi, Kela et al. 2002; Lin, Sengupta et al. 2009). A pesar de la identificación de dianas específicas de p73, parece que la apoptosis mediada por p73 se lleva a cabo por la activación de genes que fueron originalmente descritos para apoptosis mediada por p53.

En el año 2010 se han publicado los modelos de ratones dobles negativos específicos para *TAp73* y para $\Delta Np73$ (Tomasini, Tsuchihara et al. 2008; Tissir, Ravni et al. 2009; Wilhelm, Rufini et al. 2010).

El modelo de ratón deficiente para la isoforma *TAp73* fue creado por medio de la delección de los exones 2 y 3 de *p73*. Se observaron las siguientes diferencias respecto al ratón deficiente para el gen *p73* completo:

1. Ambos modelos de ratones son infértiles, pero las causas son distintas. Los ratones nulos para *TAp73* tienen disminuida la producción de oocitos, que además no progresan hasta las trompas de Falopio. En los nulos para *p73* completo esta esterilidad se debe a defectos en las vías sensorias y hormonales, que impiden el apareamiento.
2. Se observa disgénesis hipocampal en ambos ratones, pero en los ratones nulos para *TAp73* no hay diferencia de pérdida neural ni ampliación ventricular.
3. Los ratones nulos para *TAp73* desarrollan tumores espontáneos, generalmente adenocarcinomas de pulmón, y son más sensibles a la formación de tumores inducidos por distintos carcinógenos químicos.

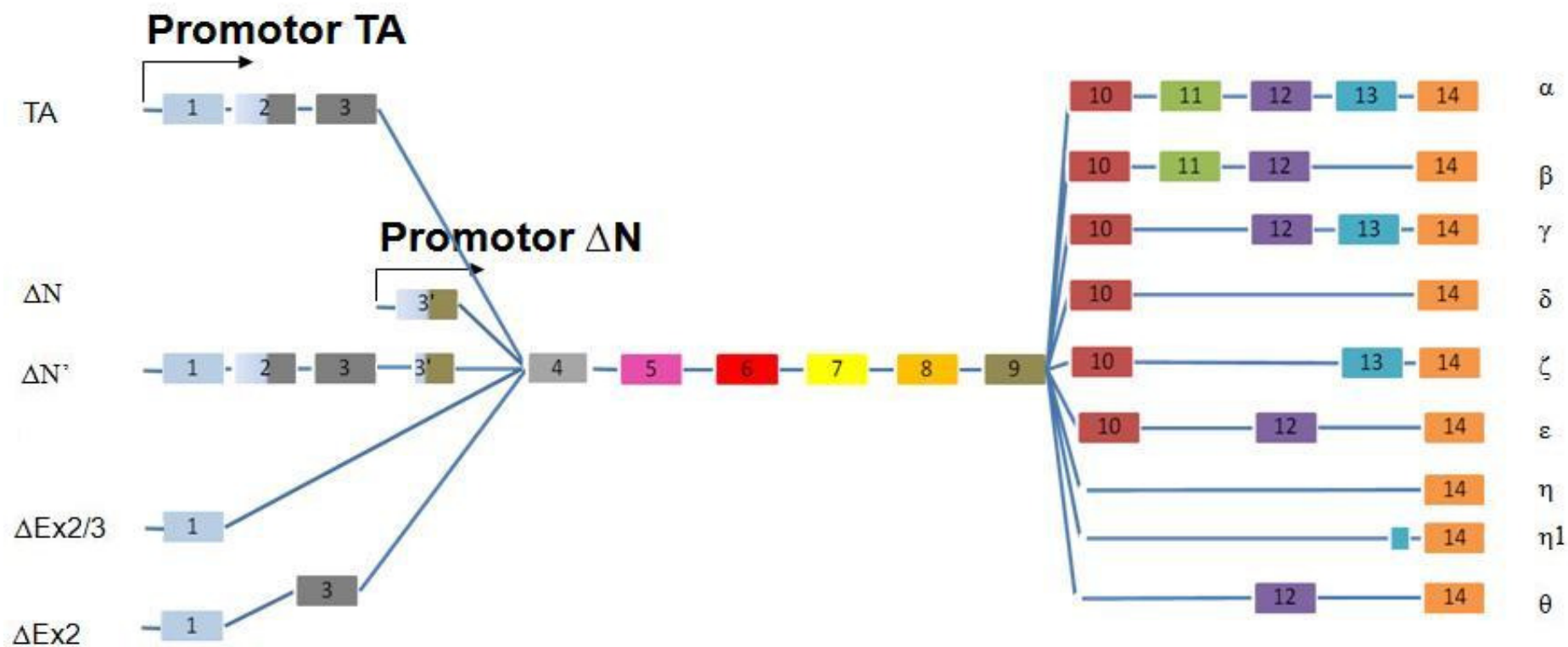
Todos estos datos confirman el papel supresor tumoral de las isoformas *TAp73*, que otros datos preliminares indirectos apoyaban. Además indican un papel crítico para *TAp73* en el mantenimiento de la estabilidad genómica que se ve reflejado tanto en la prevención de la formación tumoral como en la infertilidad.

Los ratones doble negativos para $\Delta Np73$ se generaron por dos equipos distintos de manera idéntica, eliminando el exón 3' del gen *p73* (Tissir, Ravni et al. 2009; Wilhelm, Rufini et al. 2010). En estos modelos se observó que:

1. Los ratones son viables y fértiles y presentan una esperanza de vida normal, a diferencia de los ratones deficientes para *TAp73* o para *p73* que la tienen reducida.
2. Estos ratones presentan una neurodegeneración paulatina con el crecimiento, lo que confirma el papel neuroprotector de $\Delta Np73$. Estos defectos no son tan severos como en el ratón deficiente para *p73*, lo que sugiere que las isoformas *TAp73* podrían igualmente jugar un papel relevante en el sistema nervioso.
3. Los ratones muestran un incremento en la expresión de los genes diana de p53 y de la apoptosis en respuesta a daño genómico, lo que confirmaría su papel como regulador negativo de algunas de las funciones mediadas por p53.
4. La pérdida de $\Delta Np73$ afecta negativamente la formación de tumores *in vivo* de una manera no asociada al incremento de apoptosis, sino a través de la inducción de senescencia, así $\Delta Np73$ sería necesario para el establecimiento de un tumor *in vivo*.
5. $\Delta Np73$ funcionaría como regulador negativo de la vía de respuesta a daño en el ADN inhibiendo la activación de la señalización mediada por ATM y p53.
6. Existen fenotipos de los ratones nulos para *TP73* completo que no se repiten en los ratones negativos para las isoformas *TAp73* y $\Delta Np73$, como las infecciones severas crónicas e inflamación que acababan matando a estos ratones. Así estas isoformas deben actuar de manera sinérgica para llevar a cabo algunas funciones concretas.

Los datos anteriores apoyan el papel de las isoformas $\Delta Np73$ como oncogenes, con un papel crítico en la resistencia a drogas y en el crecimiento tumoral.

Figura 3. Esquema del gen *p73* y sus isoformas.



4. CÁNCER Y ANGIOGÉNESIS

Se denomina angiogénesis a la formación de vasos sanguíneos por gemación o brote de vasos sanguíneos ya existentes, a diferencia de la vascularización que es la creación de novo de vasos sanguíneos. La angiogénesis consta de distintas etapas:

- Señal angiogénica y respuesta proliferativa.
- Degradación de la lámina basal.
- Migración y proliferación de células endoteliales.
- Síntesis de lámina basal y diferenciación de nuevos vasos.

Se considera que los tumores primarios constituyen una masa celular proliferativa avascular hasta que alcanzan entre los 2-3mm, un tamaño que no permite la difusión de oxígeno y nutrientes (Folkman 1972). Esta hipoxia desencadena la activación de la señal angiogénica y la respuesta proliferativa de vasos sanguíneos hasta el tumor. Este es un paso crítico para el mantenimiento del tumor y para la generación de la metástasis (Ferrara, Winer et al. 1993; Hanahan and Folkman 1996).

Se han descrito varios factores importantes para el proceso de angiogénesis, de entre ellos destaca *VEGF* (del inglés vascular endotelial growth factor). Su gen localizado en el cromosoma 6p12 es un miembro de la familia de factores de crecimiento *PDGF/VEGF* y codifica una proteína que se encuentra a menudo como un homodímero unido por puentes disulfuro. La proteína es un mitógeno glicosilado que actúa específicamente sobre las células endoteliales y tiene efectos diversos, incluyendo la mediación de un aumento en la permeabilidad vascular, inducción de la angiogénesis, la vasculogénesis y el crecimiento de células endoteliales, promueve la migración celular e inhibe la apoptosis. Se han caracterizado distintos procesamiento alternativo del mensajero que codifican proteínas libres secretadas o isoformas asociadas a las células. Respecto a su regulación, se le conocen varios reguladores, pero los más destacados son HIF1 α y HIF2 α (Jones, Fujiyama et al. 2001). Dado su papel esencial en la angiogénesis tumoral y eventualmente en la metástasis es importante identificar reguladores de *VEGF*.

Actualmente se están usando en clínica varias moléculas cuya diana es VEGF en el tratamiento de los enfermos con cáncer, como bevacizumab (avastin), vatalanib, sorafenib y talidomina (Hurwitz, Fehrenbacher et al. 2004; Crane, Ellis et al. 2006).

VEGF ejerce sus efectos sobre el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos al unirse y activar dos receptores de membrana tirosin-kinasa, el VEGFR-1 y el VEGFR-2, que son expresados por las células endoteliales de la pared vascular. La unión de VEGF a estos receptores inicia una cascada de señales que finalmente estimula el crecimiento, la supervivencia y la proliferación de las células del endotelio vascular (Mazure, Chen et al. 1997; Gerber, McMurtrey et al. 1998; Rak, Mitsuhashi et al. 2000; Arsham, Plas et al. 2002). Se ha encontrado un aumento de la expresión de *VEGF* a nivel de ARNm en casi todos los tumores conocidos (Ferrara and Davis-Smyth 1997). Se ha observado una correlación positiva entre la expresión de *VEGF* en el tumor y su vascularización, y con el pronóstico de los pacientes (Takebayashi, Aklyama et al. 1996; Tokunaga, Oshika et al. 1998; Vermeulen, Van den Eynden et al. 1999; Paradis, Lagha et al. 2000; Gasparini 2001). En adición, varias alteraciones específicas transformantes pueden inducir la expresión de *VEGF*, tales como mutaciones inactivadoras de *p53* y mutaciones oncogénicas de *K-ras* (Mukhopadhyay, Tsiokas et al. 1995; Rak, Filmus et al. 1995; Rak, Mitsuhashi et al. 1995). Es interesante el hecho de que VEGF podría promover proliferación afectando la expresión de la familia de factores de transcripción *E2F* (Zhu, Jin et al. 2003).

Como consecuencia del procesamiento alternativo de su ARNm, *VEGF* puede dar lugar a distintas variantes, siendo las más abundantes en la célula *VEGF*₁₆₅ y *VEGF*₁₂₁. Niveles elevados de la variante *VEGF*₁₈₉ también se han asociado con un peor pronóstico de los pacientes. Otras variantes son *VEGF*₁₈₃ y *VEGF*₂₀₆ y *VEGF*₁₄₅, características de células de origen placentario (Houck, Ferrara et al. 1991; Ferrara and Davis-Smyth 1997; Poltorak, Cohen et al. 1997; Jingjing, Xue et al. 1999; Whittle, Gillespie et al. 1999). Recientemente se han identificado nuevas variantes que contienen un nuevo exón localizado en la región carboxilo terminal, el 8b (Bates, Cui et al. 2002), y que se han denominado *VEGF*_{xxx}*b*. Estas variantes son capaces de unirse a su receptor, pero son inactivas a la hora de la transducción de la señal, proponiéndose a estas variantes como inhibidores de esta vía.

Sólo se dispone de algunos datos funcionales para la isoforma *VEGF*_{165b}. *VEGF*_{165b} inhibiría la inducción de angiogénesis en la cornea del conejo y en el mesenterio de rata y el crecimiento de tumores xenotransplantados en ratones (Woolard, Wang et al. 2004). Además *VEGF*_{165b} ha sido encontrado disminuido en cánceres humanos renales y de próstata (Bates, Cui et al. 2002; Woolard, Wang et al. 2004). En

pacientes con melanoma primario, la ausencia de *VEGF_{165b}* predice la enfermedad metastásica (Pritchard-Jones, Dunn et al. 2007).

4.1 Implicación de las isoformas de p73 en el proceso angiogénico en cáncer de colon

En cuanto a su regulación, se ha descrito que la proteína p53 puede reprimir la expresión de *VEGF* (Zhang, Yu et al. 2000). Por homología, se ha estudiado si p73 podría estar actuando de igual manera, pero los resultados son controvertidos. Mientras algunos datos apuntan a p73 como un represor de la expresión de *VEGF* (Salimath, Marme et al. 2000), otras investigaciones apoyan su papel como inductor de la expresión de *VEGF* (Vikhanskaya, Bani et al. 2001; Guan, Peng et al. 2003). Quizás las distintas isoformas de *p73* jueguen papeles opuestos.

Curiosamente parece que p73 pudiera estar implicado en angiogénesis a través de la regulación de otra proteína relacionada con este proceso, *PEDF* (del inglés pigment epithelium-derived factor), cuyo gen se localiza en el cromosoma 17p13.1. En células cancerígenas se ha observado que la expresión de *PEDF* es inducida por p73 (Sasaki, Naishiro et al. 2005). *PEDF* es una glicoproteína secretada expresada en muchos tejidos y que actúa como un factor neurotrópico y un inhibidor natural de la angiogénesis en cáncer de próstata, páncreas, ojo, células de carcinoma hepático y en melanoma (Dawson, Volpert et al. 1999; Crawford, Stellmach et al. 2001; Doll, Stellmach et al. 2003; Garcia, Fernandez-Garcia et al. 2004; Matsumoto, Ishikawa et al. 2004). La pérdida de *PEDF* está implicada con la progresión del glioma, y en adenocarcinoma pancreático la expresión de *PEDF* es un factor de pronóstico favorable (Guan, Yam et al. 2003; Uehara, Miyamoto et al. 2004). En fibroblastos adultos nulos para *VEGF* se observa que la oncoproteína ras regula negativamente los niveles de *PEDF* dando lugar a fibrosarcomas altamente tumorogénicos y angiogénicos (Vilorio-Petit, Miquerol et al. 2003). En células de osteosarcomas, *PEDF* inhibe la expresión de *VEGF* tanto a nivel de ARNm como de proteína, mientras que en células de carcinoma oral escamoso *VEGF* induce la expresión de *PEDF* a nivel de ARNm y su secreción (Miyagishi, Ohno-Matsui et al. 2003; Takenaka, Yamagishi et al. 2005).

5. MECANISMOS REGULADORES DE LA EXPRESIÓN DE *p73*

Debido al impacto que los niveles de expresión de las distintas isoformas de *p73* pueden tener en el pronóstico de los pacientes con cáncer (Stiewe, Tuve et al. 2004; Uramoto, Sugio et al. 2004; Muller, Schilling et al. 2005; Becker, Pancoska et al. 2006; Dominguez, Garcia et al. 2006; Liu, Chan et al. 2006; Wager, Guilhot et al. 2006; Zitterbart, Zavrelova et al. 2007), sería de interés identificar mecanismos y/o componentes que puedan estar regulándolas. Se conoce que *p73* puede ser activado por distintas señales de estrés ya sea a través de vías compartidas con *p53* o vías diferentes (Wulf, Liou et al. 2002; Zacchi, Gostissa et al. 2002; Zheng, You et al. 2002; Mantovani, Piazza et al. 2004)

Tras daño en el ADN, el factor de transcripción E2F1 se une a sus zonas de unión en los promotores de *p73* activando la transcripción de las isoformas generadas a partir de los mismos (Stiewe, Theseling et al. 2002; Putzer, Tuve et al. 2003), aunque algunos autores sugieren que el promotor secundario alternativo pudiera no estar regulado directamente por E2F (Stiewe, Tuve et al. 2004). Por otra parte se conoce la existencia de una región reguladora negativa de la expresión de *p73* de 1Kb localizada en el primer intrón. Esta región es ocupada por ZEB1, que inhibe la expresión de las formas *TAp73* y $\Delta Np73$ (Fontemaggi, Gurtner et al. 2001). Nuestro grupo ha descrito una delección de 73 pb en esta región en pacientes con cáncer de colon. La presencia de la delección se asocia a disminución de los niveles de la variante *TAp73*, modificando el ratio *TAp73*/ $\Delta Np73$ a favor de las oncogénicas (Dominguez, Pena et al. 2006). Otro regulador de la transcripción de *p73* es Egr1 que induce su expresión tras la unión al promotor (Yu, Baron et al. 2007). No hay que olvidar que tanto *p53* como *TAp73* pueden inducir *in vitro* la expresión de $\Delta Np73$ directamente activando la transcripción desde el promotor secundario (P2) del gen *p73* (Grob, Novak et al. 2001; Kartasheva, Contente et al. 2002; Nakagawa, Takahashi et al. 2002).

*5.1 Regulación de las isoformas de *p73* por vitamina D y survivina*

Se ha descrito que la 1 α ,25-dihidroxit vitamina D₃ (1,25(OH)₂D₃), forma activa de la hormona secosteroidea vitamina D, puede aumentar los niveles de proteína de *TAp73* en un modelo de carcinoma de células escamosas, lo que sensibiliza a las células a la inhibición de crecimiento mediada por cisplatino y a apoptosis (Ma, Yu et

al. 2008). Curiosamente, otro grupo ha observado que la inducción de *VDR* (receptor de la vitamina D) después de daño en el ADN podría ser dependiente de p73 (Kommagani, Payal et al. 2007).

La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ejerce sus funciones clásicas regulando genes implicados en la formación de huesos y homeostasis del calcio a través de su interacción con VDR (Demay 2006). Además, se ha descrito que $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ muestra propiedades antiproliferativas (Campbell, Gombart et al. 2000; Banerjee and Chatterjee 2003), induce diferenciación celular y apoptosis, suprime invasividad y modula al sistema inmunitario (Gombart, Luong et al. 2006; Deeb, Trump et al. 2007; Hawker, Pennypacker et al. 2007). Actualmente se están llevando a cabo distintos ensayos clínicos que evalúan la respuesta al tratamiento con diferentes análogos no hipercalcémicos de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en pacientes con cáncer de colon y otras neoplasias (Hansen, Binderup et al. 2001; Dalhoff, Dancey et al. 2003; Lamprecht and Lipkin 2003; Trump, Hershberger et al. 2004; Deeb, Trump et al. 2007).

Recientemente se ha descrito que la vitamina D y alguno de sus análogos sintéticos disminuyen los niveles de ARNm y proteína de survivina en células de cáncer de mama, este hecho se asocia con la apoptosis inducida por la vitamina D (Li, Ling et al. 2005). Además, se ha observado que la expresión ectópica de survivina en células de carcinoma de mama puede regular positivamente TAp73 y $\Delta\text{Np}73$ a nivel de ARNm y proteína (Wang, Fukuda et al. 2004). Aunque no se ha descrito que survivina pueda tener una función de factor de transcripción que explique este hecho, se ha observado en *C. elegans* que la proteína BIR-1, homóloga de survivina, puede participar en la regulación de la transcripción de ciertos genes a través de la modificación de los patrones de acetilación de histonas (Kostrouchova, Kostrouch et al. 2003).

Survivina, localizado en el cromosoma 17q25 (Altieri 2008), es un miembro de la familia génica de inhibidores de la apoptosis (IAP). Survivina sufre procesamiento alternativo que generan distintas variantes proteicas (Sampath and Pelus 2007). La sobreexpresión de survivina en diversos sistemas celulares se ha asociado con la inhibición de muerte celular, y la supresión específica de su función causa muerte celular espontánea (Altieri 2003). Además, survivina es esencial en la regulación de la mitosis y la división celular (Altieri 2006). La compartimentación subcelular de survivina podría explicar sus funciones claramente distintas (Altieri 2008). Survivina se expresa de bajos niveles a indetectable en la mayoría de tejidos normales y está excesivamente representada en los tumores humanos (Fukuda and Pelus 2006). Esta

sobre-regulación en pacientes con cáncer se correlaciona con un peor pronóstico de la enfermedad (Kawasaki, Altieri et al. 1998; Lu, Altieri et al. 1998; Hinnis, Luckett et al. 2007; Nouraei, Mowla et al. 2009; Yamashita, Chujo et al. 2009). Es llamativo que la secuencia codificante de survivina sea ampliamente complementaria a la del receptor del efector de proteasa 1 (EPR-1), localizado en la misma región cromosómica que survivina pero orientado en dirección opuesta, y aunque no se ha confirmado, EPR-1 podría funcionar como un anti-sentido natural de survivina (Adida, Crotty et al. 1998; Shinozawa, Inokuchi et al. 2000; Yamamoto, Manome et al. 2002). Los niveles de expresión de *EPR-1* y su valor pronóstico en tumores humanos ha sido poco estudiada (Shinozawa, Inokuchi et al. 2000; Yamamoto, Manome et al. 2002; Yao, Liu et al. 2004; Oto, Paydas et al. 2007).

6. IMPLICACIÓN DE LAS ISOFORMAS DE *p73* EN PROCESOS DE QUIMIO-RESISTENCIA

La resistencia a drogas citotóxicas se considera una de las mayores causas del fallo clínico de la quimioterapia oncológica (Perez, Hamilton et al. 1993). Casi el 50% de los pacientes con cáncer presentan tumores que son resistentes a los fármacos empleados, esta resistencia se ha desarrollado durante el curso del tratamiento a pesar de haber presentado respuesta inicial al mismo (Kirschner, Greenberger et al. 1992). Se estima que la resistencia a drogas contribuye a más del 90% de las muertes por cáncer (Lum, Fisher et al. 1993).

Aunque una gran variedad de drogas quimioterápicas inducen la expresión de *p73* y su inhibición conduce a que células tumorales humanas sean quimio-resistentes, algunos datos apuntan que las variantes $\Delta TAp73$ pueden conferir resistencia a drogas a las células tumorales que expresan *p53* nativa y formas *TAp73* (Muller, Schleithoff et al. 2006). Se conoce que la respuesta celular después de daño al ADN implica a los productos de los genes supresores *p53* y *p73* (Concin, Hofstetter et al. 2005; Vilgelm, Wei et al. 2008). En respuesta a daño genómico, se produce la acumulación de la proteína *p53* nativa en el núcleo dando lugar a la parada del ciclo celular en la fase G1, lo que permitirá a la célula reparar el daño inducido. En el caso de que el daño no pueda ser reparado, la proteína *p53* inducirá la muerte por apoptosis (Javelaud and Besancon 2002). *TAp73* puede participar en esta inducción de muerte activando la transcripción de los mismos genes que transactiva *p53* (Harms, Nozell et al. 2004), como es el caso de *caspasa-1* (Gupta, Radha et al. 2001). Se ha descrito que *TAp73* puede regular la transcripción de *caspasa-1* inducida por IFN- α y por cisplatino (Jain, Gupta et al. 2005). La función primaria de la *caspasa-1* es el proceso proteolítico de los precursores de citoquinas proinflamatorias (Gupta, Radha et al. 2001). *Caspasa-1* está implicada también en la inducción de apoptosis (Whyte 1996). Los ratones nulos para *caspasa-1* se desarrollan normalmente pero tienen una producción deficiente de las citoquinas maduras interleuquina-18 e interleuquina-1 β . Estos ratones son resistentes al choque séptico y muestran un defecto parcial en la apoptosis (Kuida, Lippke et al. 1995; Li, Allen et al. 1995). *Caspasa-1* se suele encontrar sobreexpresada en líneas celulares resistentes a cisplatino (Nagatani, Nomoto et al. 2001), aunque se ha descrito en distintos estudios una pérdida de su expresión en varios tipos de cánceres humanos como gástrico, ovario, colon y próstata (Jarry, Vallette et al. 1999; Winter, Kramer et al.

2001; Feng, Li et al. 2005; Jee, Lee et al. 2005). Esta pérdida de *caspasa-1* se asocia con supervivencias más cortas en pacientes con cáncer gástrico (Jee, Lee et al. 2005), con resistencia al tratamiento en cáncer de colon (Jarry, Vallette et al. 1999) y con una resistencia a apoptosis en células de cáncer de ovario (Feng, Li et al. 2005). Debido al importante papel que juega caspasa-1 en inducción de apoptosis, que la pérdida de su expresión se ha relacionado con resistencia a drogas en ciertos tumores, como cáncer de colon, y que es un posible efector de las isoformas de *p73*, *caspasa-1* fue elegida para su estudio en nuestra serie de pacientes.

Por otra parte se ha descrito que las isoformas oncogénicas de *p73* inducen la expresión de *MDR1* y *HMG1* (Uramoto, Izumi et al. 2003; Johnson, Shepard et al. 2005; Vilgelm, Wei et al. 2008). El fenotipo MDR, resistente a múltiples drogas, está asociado con la sobreexpresión del gen *MDR1* que codifica una glicoproteína asociada a membrana, la glicoproteína-P, que causa el descenso de la acumulación intracelular de una gran variedad de drogas citotóxicas (Beck 1987). El promotor de *MDR1* fue uno de los primeros que se describió que era reprimido por p53 (Chin, Ueda et al. 1992). Por homología se estudió el papel de *p73* en este escenario y se ha descrito que las isoformas *TAp73alfa*, *beta* y *gamma* pueden activar al gen de resistencia a drogas *MDR1* (Johnson, Shepard et al. 2005) y también que $\Delta Np73$ regula la función de *MDR1* inhibiendo a p53 (Vilgelm, Wei et al. 2008). HMG1, se ha implicado en multitud de procesos biológicos importantes incluyendo transcripción, reparación del ADN, recombinación, diferenciación, desarrollo y señalización extracelular. HMG1 puede interaccionar *in vitro* tanto con el ADN (especialmente con el ADN modificado por drogas anticancerígenas, como el cisplatino) y con numerosas proteínas, como p53 o los receptores de hormonas esteroideas (Boonyaratanakornkit, Melvin et al. 1998; Jayaraman, Moorthy et al. 1998; Imamura, Izumi et al. 2001). Los datos demuestran que al unirse a las hormonas esteroideas y por otro lado al ADN modificado con cisplatino, HMG1 facilita la formación de un complejo más estable de unión y aumenta la actividad de transcripción de estas hormonas, aumentando la sensibilidad a cisplatino de las células de cáncer de mama (He, Liang et al. 2000). Existen datos controvertidos en la literatura respecto al papel de *HMG1* en quimio-resistencia, ya que se ha descrito que la expresión ectópica de *HMG1* disminuye la transactivación del promotor del gen Bax en las células de osteosarcoma SAOS-2 (Stros, Ozaki et al. 2002).

7. CONSIDERACIONES FINALES/HIPÓTESIS

7.1. Análisis del perfil de expresión de las distintas isoformas de p73 en cáncer de colon y mama

Cada vez son más las evidencias que apuntan que el gen *p73* juega un papel supresor u oncogénico dependiendo de sus isoformas. La mayoría de los estudios realizados hasta el momento analizando los niveles de expresión en tumores humanos, no han hecho distinción entre las isoformas con función supresora tumoral y las oncogénicas. Luego nuestras hipótesis son:

1. La sobreexpresión de las isoformas de *p73* con funciones oncogénicas podrían estar implicadas en el desarrollo tumoral y en la evolución del paciente. El ratio entre la isoformas supresoras tumorales y las oncogénicas nos podrían dar información acerca de la implicación de *p73* en la carcinogénesis en humanos.
2. En los tumores con p53 nativa, la sobreexpresión de las isoformas oncogénicas de *p73* podría ser clave en el proceso tumorogénico.
3. E2F-1 está descrito como un posible regulador de *p73* in vitro, luego su relación con las variantes oncogénicas en la serie de pacientes apoyaría este dato in vivo.
4. Se ha descrito que $\Delta Np73$ podría cooperar con K-ras oncogénico en la transformación celular en ratones. La coexpresión de ambos en la serie de pacientes corroboraría esta cooperación en la transformación en humanos.
5. Posible valor como marcador, idealmente de pronóstico, en clínica de las alteraciones en la expresión de las isoformas de *p73* mediante el análisis de su correlación con otros parámetros histológicos de los tumores, ya establecidos como de valor pronóstico, con la respuesta al tratamiento, con las tasas de recaídas, con el periodo libre de enfermedad (SLE) y con la supervivencia global de los enfermos (SG)

7.2. Implicación de las isoformas de *p73* en el proceso angiogénico en cáncer de colon

La angiogénesis de los tumores supone un paso previo a la formación de metástasis. Se ha relacionado en distintos estudios la sobreexpresión del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) con una mayor vascularización de los tumores. Distintas publicaciones sugieren un posible papel de *p73* en la regulación de los niveles de expresión de *VEGF*. Además se ha descrito que *VEGF* sufre un procesamiento alternativo que da lugar a variantes con propiedades antiangiogénicas, *VEGF_{xxx}b*. También se ha descrito la implicación de *p73* en la regulación de otro factor antiangiogénico, *PEDF*. Debido al impacto que el desarrollo de metástasis tiene en la evolución clínica de los pacientes, nuestras hipótesis de trabajo son las siguientes:

1. Posible papel de las variantes con papel oncogénico de *p73* en la inducción de la expresión del factor angiogénico *VEGF* y en la represión de las anti-angiogénicas, *VEGF₁₆₅b* y *PEDF*. La relación entre los niveles de las distintas formas de *p73* y *VEGF*, *VEGF₁₆₅b* y *PEDF* nos dará información acerca del papel oncogénico de ciertas isoformas de *p73* como promotoras de neovascularización e inducción de metástasis.

2. Posible papel de las variantes con papel supresor de *p73* en la inhibición de la expresión del factor angiogénico *VEGF* y en la inducción de las anti-angiogénicas *VEGF₁₆₅b* y *PEDF*. Función protectora de las formas supresoras de *p73* frente a angiogénesis y metástasis.

3. Posible valor de los niveles de expresión de *VEGF₁₆₅b* y *PEDF* (no evaluado anteriormente) como marcadores de pronóstico en el ámbito clínico.

7.3. Mecanismos reguladores de la expresión de *p73*

Debido al impacto que los niveles de las distintas isoformas de *p73* pueden tener en la evolución de los pacientes, es interesante conocer los mecanismos/proteínas que pueden estar regulándolos. Así, nuestras hipótesis son las siguientes, cuyo posible mecanismo molecular se resumen en la figura 4:

1. La vitamina D3 a través de su receptor VDR, podría estar regulando negativamente los niveles de las isoformas oncogénicas de *p73* y positivamente las formas supresoras en células tumorales de mama y colon. Así en parte, la función antitumoral descrita para vitamina D3 podría ser debida a su capacidad de regular negativamente los niveles de las distintas formas oncogénicas de *p73*.

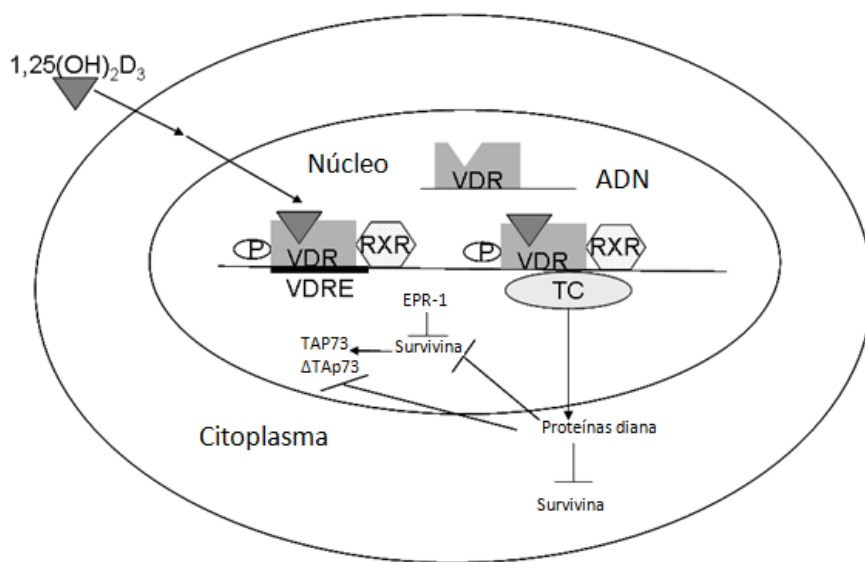
2. La regulación de la expresión de las distintas isoformas de *p73* por vitamina D3 en células tumorales de mama y colon podría ser dependiente y/o independientemente de survivina. Survivina está sobreexpresada en la mayoría de tumores humanos. Esta expresión elevada se asocia a quimio-resistencia, mayores tasas de recaídas y menor supervivencia de los pacientes, características también asociadas a la sobre-expresión de formas oncogénicas de *p73*. Además, survivina tiene un anti-sentido natural en su propia secuencia, *EPR1*, cuya expresión sería interesante analizar en tumores sólidos.

3. Survivina podría estar regulando a las distintas isoformas de *p73* a nivel transcripcional a través de cambios epigenéticos.

4. Una autorregulación VDR-*p73* podría existir en las líneas celulares tumorales de mama y de colon.

5. Estos mecanismos podrían observarse también en muestras tumorales de pacientes diagnosticados con cáncer de colon y de mama.

Figura 4. Hipótesis de la regulación de las isoformas de *p73* por vitamina D de manera dependiente e independiente de survivina.



7.4. Implicación de las isoformas de p73 en procesos de químio-resistencia

Algunos datos apuntan que las variantes $\Delta TAp73$ pueden conferir resistencia a drogas a células tumorales que expresan p53 nativa y variantes $TAp73$. También se ha descrito la modulación de la expresión por las distintas variantes de $p73$ de distintos genes relacionados con la resistencia a quimioterápicos como son *MDR1*, *HMGI* y *caspasa-1*. Nuestras hipótesis en éste área son:

1. Las isoformas oncogénicas de $p73$ podrían inducir la expresión de *MDR1* y *HMGI* y la isoforma supresora tumoral la expresión de *caspasa-1*, en nuestras series de pacientes, al igual que se ha descrito in vitro.

2. Posible valor como marcador, idealmente de pronóstico, en clínica de las alteraciones en la expresión de los genes dianas de las isoformas de $p73$ implicados en resistencia a drogas, *MDR1*, *HMGI* y *caspasa-1* mediante el análisis de su correlación con otros parámetros histológicos de los tumores, ya establecidos como de valor pronóstico, con la respuesta al tratamiento, con las tasas de recaídas, con el periodo libre de enfermedad (SLE) y con la supervivencia global de los enfermos (SG) .

OBJETIVOS

1. ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE LAS DISTINTAS ISOFORMAS DE *p73* EN CÁNCER DE COLON Y MAMA

1.1. Determinación de los niveles de expresión de las distintas isoformas de *p73* y su valor pronóstico en estos tumores.

1.2. Comprobar si la expresión de las formas oncogénicas de *p73* alivia la presión selectiva de tumores con p53 alterado.

1.3. Estudiar si existe correlación entre los niveles de expresión de las isoformas de *p73* y el factor de transcripción *E2F-1*.

1.4. Analizar si las mutaciones oncogénicas en *K-ras* ocurren de manera concomitante con alteraciones en los niveles de expresión de *p73*.

2. IMPLICACIÓN DE LAS ISOFORMAS DE *p73* EN EL PROCESO ANGIOGÉNICO EN CÁNCER DE COLON

2.1. Determinar los niveles del factor pro-angiogénico, *VEGF* y de los anti-angiogénicos, *VEGF_{165b}* y *PEDF* y de su valor pronóstico.

2.2. Evaluar las relaciones entre los niveles de estos genes y la expresión de las distintas isoformas de *p73*.

2.3. Estudiar la influencia de las mutaciones en p53 y *K-ras* en los niveles de expresión de *VEGF*, *VEGF_{165b}* y/o *PEDF*.

3. MECANISMOS REGULADORES DE LA EXPRESIÓN DE *p73*

3.1. Analizar si la exposición a vitamina D3 modifica los niveles de survivina y de las distintas isoformas de *p73*.

3.2. Estudiar si la expresión ectópica de survivina modifica los niveles de mensajero y/o proteína de las distintas isoformas de *p73*.

3.3. Investigar si survivina regula la transcripción de las distintas isoformas de *p73* por mecanismos epigenéticos.

3.4. Determinar la correlación entre los niveles de expresión de las distintas isoformas de *p73*, *survivina*, *VDR* y *EPRI*, y su comportamiento en cáncer de colon y mama.

4. IMPLICACIÓN DE LAS ISOFORMAS DE *p73* EN PROCESOS DE QUÍMIO-RESISTENCIA

4.1. Analizar los niveles de expresión de los genes asociados con procesos de resistencia a drogas, *MDR1*, *HMG1* y *caspasa-1*, y las posibles relaciones entre dichos genes con las distintas isoformas de *p73* en cáncer de colon.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. PACIENTES Y MUESTRAS

Este estudio ha sido diseñado y realizado en el Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda, y aprobado por su Comité de Ética e Investigación Clínica. Se ha contado con muestras de tejido normal y tumoral de 113 pacientes operados de cáncer de colon y 60 pacientes operadas de cáncer de mama entre los años 1998 y 2003. Todos los pacientes de cáncer de colon fueron considerados representantes de la forma esporádica de la enfermedad, ya que aquellos que pertenecían a familias con poliposis adenomatosa familiar o cáncer de colon hereditario no polipósico, según los criterios de Ámsterdam, fueron excluidos. Las pacientes de cáncer de mama esporádico seleccionadas para el estudio no mostraron evidencia de enfermedad diseminada en el momento del diagnóstico. Tanto el tejido tumoral como el normal se obtuvieron secuencialmente, inmediatamente después de la cirugía, y se conservaron a -80° hasta su posterior procesamiento. Todas las muestras tumorales fueron histológicamente examinadas por patólogos para: a) establecer el diagnóstico de adenocarcinoma de colon o mama e identificar el subtipo histológico del cáncer de mama; b) confirmar que cada muestra estaba compuesta por un mínimo de 75% de tejido tumoral; y c) elaborar el estadio patológico.

Se utilizó un número diferente de casos para cada uno de los estudios que conforman este trabajo, así:

- El estudio de comparación entre el tejido normal y tumoral para establecer los niveles de expresión de las distintas isoformas de *p73* y *E2F-1* y sus posibles relaciones entre ellas además de las relaciones con diferentes características clinicopatológicas de los pacientes, se realizó en 113 muestras de tejido tumoral y el adyacente normal de cáncer de colon y 60 de cáncer de mama. También se determinó el estatus de *p53* y en los pacientes con carcinoma de colon se determinó el estado de *K-ras*.
- El estudio para establecer las posibles correlaciones entre las isoformas de *p73* y de las distintas variantes de *VEGF* y de *PEDF* se llevó a cabo en 112 que se engloban en la primera serie ya comentada de 113 pacientes de cáncer de colon.
- El estudio de comparación entre el tejido normal y tumoral para establecer los niveles de expresión de *VDR*, survivina y *EPR-1*, las posibles relaciones entre dichos genes y además con las distintas isoformas de *p73* y las

relaciones con diferentes características clinicopatológicas de los pacientes, se realizó en 75 pacientes de cáncer de colon que se engloban en la primera serie y en los 60 pacientes de cáncer de mama.

- El estudio de comparación entre el tejido normal y tumoral para establecer los niveles de expresión de *MDR1*, *HMGI* y *caspasa-1*, las posibles relaciones entre dichos genes con las distintas isoformas de *p73* y sus relaciones con la supervivencia libre de enfermedad y la global, se llevó a cabo en 77 pacientes de cáncer de colon que se engloban en la primera serie de pacientes.

1.1 Características clínico-patológicas de los pacientes

Se revisaron las historias clínicas de cada uno de los 113 pacientes de cáncer de colon para determinar su sexo, y fecha de nacimiento, así como cada uno de los siguientes parámetros patológicos (Tabla 1):

- tamaño del tumor
- localización del tumor
- afectación ganglionar
- estadio
- invasión vascular
- diferenciación tumoral
- presencia de pólipos en la pieza quirúrgica

El estadio fue calculado según la clasificación de TNM que valora el tamaño tumoral, la afectación ganglionar y la existencia de metástasis. La afectación ganglionar se evaluó por microscopia óptica. Ninguna otra técnica molecular o inmunohistoquímica fue usada.

El seguimiento clínico de los pacientes, después de la cirugía, que incluía perfil bioquímico (con niveles de CEA) y estudio radiológico, se realizó cada tres meses durante el primer año, cada seis meses durante el segundo año y después anualmente excepto en caso de recaída que se ajustó a las circunstancias de cada paciente. También se realizó una colonoscopia anual. Se consideró supervivencia libre de enfermedad (SLE) desde el día de la cirugía hasta el día de diagnóstico de una recaída, y periodo de supervivencia global (SG) el comprendido entre el día de la cirugía y la fecha de la última revisión o el día del fallecimiento del paciente.

También se obtuvieron los parámetros clínicos de las 60 pacientes de cáncer de mama revisando las historias clínicas de cada una de las pacientes para determinar edad, así como cada uno de los siguientes parámetros patológicos (Tabla 1):

- tamaño del tumor
- afectación ganglionar
- presencia de receptores de esteroides (estrógeno y progesterona)
- estadio
- grado histológico
- índice proliferativo
- expresión de erb-B2
- invasión vascular

El estadio fue elaborado según la clasificación de TNM. Los niveles de expresión de los receptores de esteroides fue determinado usando un procedimiento inmunohistoquímico. El índice proliferativo se calculo usando el antígeno Ki-67 (Immunotech, Westbrook, ME) en los análisis inmunohistoquímicos y fue considerado elevado en aquellos casos que tenían una tinción positiva nuclear mayor o igual al 15% de las células epiteliales. La expresión de erb-B2 fue evaluada usando el anticuerpo monoclonal de ratón CB11 (Novocastra Lab Ltd, Newcastle, Reino Unido). Los niveles de erb-B2 fueron considerados sobreexpresados cuando el 15% o más de las células epiteliales de las muestras de tejidos tenían una tinción positiva intensa de la membrana.

El grado de diferenciación fue realizado de acuerdo con el porcentaje de aparición glandular en el tumor, distinguiéndose en tumores bien, moderados y poco diferenciados.

Tabla 1. Características de las series de pacientes con cáncer colon (izquierda) y mama (derecha)

Características serie colon	Total (%)	Características serie mama	Total (%)
Pacientes	113	Pacientes	60
Edad media	70.5± 10.8	Edad media	65.5±17.8
Sexo		Tipo histológico	
Hombre	61 (54%)	Ductal	45 (75%)
Mujer	52 (46%)	Lobulillar	7 (11.7%)
Localización tumoral		Otro	8 (13.3%)
Izquierda	47 (41.6%)	Grado histológico	
Derecha	37 (32.7%)	1	10 (16.6%)
Recto	29 (25.7%)	2	15 (25%)
Estadio tumoral		3	35 (58.4%)
I	12 (10.6%)	Estadio tumoral	
II	64 (56.6%)	I	5 (8.3%)
III	31 (27.4%)	II	40 (66.7%)
IV	6 (5.4%)	III	15 (25%)
Invasión Vascular		Tamaño tumoral	
Si	68 (60.2%)	< 2 cm	25 (41.6%)
No	45 (39.8%)	≥ 2 cm	35 (58.4%)
Presencia de polipos		Invasión vascular	
Si	81 (71.7%)	Si	35 (58.3%)
No	32 (28.3%)	No	25 (41.7%)
Afectación ganglionar		Afectación ganglionar	
Negativa	76 (67.25%)	< 3	49 (81.7%)
Positiva	37 (32.75%)	≥ 3	11 (18.3%)
Diferenciación tumoral		Receptores de estrogenos	
Bien	68 (60.2%)	Positivos	12 (20%)
Moderada	38 (33.6%)	Negativos	48 (80%)
Pobre	7 (6.2%)	Receptores de progesterona	
		Positivos	22 (36.7%)
		Negativos	38 (63.3%)

2. CULTIVOS CELULARES

Distintas líneas celulares derivadas de cáncer de mama humano (MCF7 y MDA-MB-453), cáncer de colon (SW480-ADH y HCT116), cáncer de pulmón (H1299 y H82), osteosarcoma (SAOs), cáncer de cuello uterino (HeLa) y células embrionarias humanas de riñón (293T) se obtuvieron de la Colección de Tipos Celulares Americana (American Type Cell Collection) y se mantuvieron en sus medios de cultivo correspondiente, 5A DMEM, RPMI 1640 o McCoy (Lonza, Madrid, España). Las células SW480-ADH son una subpoblación derivada de la línea celular SW480, muestran un fenotipo adhesivo, expresan niveles sustanciales de VDR y por lo tanto responden al tratamiento con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Palmer, Gonzalez-Sancho et al. 2001). Todos los tipos celulares se cultivaron a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂, cada medio de cultivo fue suplementado con 10% suero fetal bovino inactivado por calor (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA), 2 mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 0.25 µg/ml de fungizona.

3. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

3.1 Extracción de ARN de tejidos y líneas celulares

Para la extracción de ARN se usó el kit de extracción de ARN “Rneasy Mini Kit” (Qiagen, Inc., Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para las extracciones de ARN de tejido tumoral y normal, se usaron aproximadamente 30 mg por cada muestra, las cuales se homogenizaron y disgregaron mecánicamente siguiendo las instrucciones del MagNA Lyser (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) en presencia de 600 µl de buffer RLT y 6 µl de β-mercaptoetanol. Después de eliminar los restos de tejido por centrifugación, se le añadió al sobrenadante 600 µl de etanol al 70%. Esta mezcla, donde se encontraba diluido el ARN total, se filtró por columnas suministradas con el kit. Después de centrifugar las columnas, se lavaron sus filtros haciendo pasar por ellas sucesivamente 700 µl de buffer RW1 y 500 µl de buffer RPE (dos veces). Finalmente el ARN total unido a la membrana de silica-gel de la columna se eluyó en 30 µl de agua bidestilada. Para las extracciones de ARN en las líneas celulares se usó un pellet de aproximadamente un millón de células, al que se añadió 600 µl de buffer RLT y 6 µl de β-mercaptoetanol, para después seguir con el protocolo habitual.

3.2 Extracción de ADN de tejidos

Para las extracciones de ADN de tejido tumoral y normal, se usaron aproximadamente 30 mg por cada muestra, las cuales se homogenizaron y disgregaron mecánicamente siguiendo las instrucciones del MagNA Lyser (Roche Diagnostics) en presencia de 600 µl de buffer de lisis ATL y proteinasa K. Después se eliminaron los restos de tejido por centrifugación. Para la extracción de ADN total del sobrenadante se usó el kit de extracción “QIAmp DNA Mini Kit” (Qiagen, Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada muestra fue incubada a 56°C durante 2 horas. Después de la incubación se añadió RNasa A, después de 2 minutos de incubación a temperatura ambiente se añadió el buffer AL e incubó 10 minutos a 70°C. Posteriormente se añadió el mismo volumen de etanol al 70% que la cantidad del buffer AL añadido. Esta mezcla, donde se encontraba diluido el ADN total, se filtró por columnas suministradas con el kit. Después de centrifugar las columnas, se lavaron sus filtros haciendo pasar por ellas sucesivamente 500 µl de buffer AW1 y 500 µl de buffer

AW2 (dos veces). Finalmente el ADN total unido a la membrana de silica-gel de la columna se eluyó en 100 µl de agua bidestilada.

3.3 Cuantificación de las extracciones

Las concentraciones de los ácidos nucleicos que se obtuvieron en cada extracción de tejido y líneas celulares fueron calculadas midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop, Wilmington, DE). De cada una de las muestras se prepararon diluciones de 50 ng/µl para el ADN y de 100 ng/µl para el ARN, para posteriormente ser usadas en las reacciones de PCR (ADN) y RT-PCR (ARN). El ratio de las absorbancias 260 nm/280 nm oscilaba en todas las muestras de tejido utilizadas entre 1.6 y 1.8, óptimo para muestras diluidas en agua.

4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Es un método “in vitro” descrito en el año 1988 (Saiki, Gelfand et al. 1988) que permite la amplificación de cantidades pequeñas de ADN genómico de manera exponencial hasta niveles fácilmente detectables por técnicas convencionales como la electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida. La técnica está basada en la repetición cíclica de una serie de procesos predeterminados de desnaturalización, apareamiento de oligonucleótidos iniciadores o cebadores de la reacción a la molécula de ADN y elongación del fragmento deseado. Para la reacción son necesarias además de la existencia de ADN genómico o ADNc (hebra de ADN producto de la transcripción reversa de una secuencia de ARN determinada), la presencia de la enzima ADN polimerasa, cada uno de los cuatro dNTPs en cantidades equimolares y una pareja de oligonucleótidos complementarios a los extremos de ADN que se desea amplificar, así como cierta concentración de iones como el Mg^{2+} que actúan como cofactores de la propia polimerasa además de estabilizar el resto de reactivos. Todas las reacciones se llevan a cabo en aparatos que someten a las muestras a ciclos de tiempo y temperatura específicos de cada uno de los procesos anteriormente señalados, denominados termocicladores. Los termocicladores usados para estos estudios fueron Gene Amp PCR system 9700 y 2700 (Applied Biosystems, Foster City, California).

4.1 Análisis mutacional del gen K-ras

Se llevó a cabo en las muestras de cáncer de colon la detección de mutaciones del proto-oncogén *K-ras*, por medio de una amplificación por PCR en un volumen de reacción de 25 μ l con una concentración final de 1X buffer PCR, 1,5 unidades de la ADN polimerasa Ampli Tag DNA polymerase (Perkin- Elmer, Roche Molecular Systems Inc, Branchburg, NJ), 200 μ mol/L de la mezcla de dNTPs, 0,6 μ mol/L de cada cebador; 2,5 mmol/L de cloruro de magnesio ($MgCl_2$), 100ng de ADN genómico como molde y agua destilada hasta alcanzar el volumen final. Para la amplificación, cada muestra fue sometida a un primer ciclo de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de PCR, cada uno de los cuales constaba a su vez de: 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 40 segundos para que se produzca la unión específica de cada cebador con su hebra complementaria, a la temperatura específica de 58°C, y elongación final a 72°C durante 30 segundos. Finalmente se sometieron a un ciclo de elongación a 72°C durante 7 min. Los productos de amplificación fueron

desnaturalizados mezclando 25 µl de la reacción con 15 µl de una solución de carga que contiene un 98% de formamida, un 0,02% de xilencianol y 0,02% de azul de bromofenol. Esta mezcla se calentó a 95°C durante 6 minutos y rápidamente fue enfriada en hielo. Este paso se realiza para desnaturalizar la doble hebra de ADN y poder detectar las mutaciones puntuales por una técnica denominada SSCP (del inglés, single strand chain electrophoresis). La SSCP es un proceso donde los productos de PCR son desnaturalizados en cadenas simples de ADN, de manera que cada hebra de un amplicón adoptará una conformación determinada, que es dependiente de su secuencia nucleotídica, que afectará a su migración en el gel. De esta manera los productos de PCR con diferencias puntuales en sus secuencias presentarán distintos patrones electroforéticos de sus fragmentos de ADN monocatenario. La electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 12% (BioRad, Hercules, CA) no desnaturalizante de radio 29:1, que se polimerizaron a temperatura ambiente con 50 µl de persulfato amónico al 25% (Boheringer Mannheim Corp., Indianápolis, IN) y 55 µl de TEMED (N,N,N',N'-tetramatiletlen-diamida) (Amresco, Solon, Ohio) en cubetas de electroforesis verticales de 18 x 24 cm de tamaño y 0.75 mm de espesor (BioRad). Los geles así preparados fueron precorridos durante 20 minutos a 600 voltios y cargados posteriormente con los productos de PCR. Una vez cargados se corrieron durante 12 horas a 250 voltios a temperatura ambiente.

Los productos de PCR se visualizaron usando un método no radioisotópico comercial (Oto, Miyake et al. 1993). Los cebadores usados para el análisis mutacional de *K-ras* fueron diseñados en la región del exón 1 que contiene los codones 12 y 13, donde se encuentran la mayoría de las mutaciones, y fueron los siguientes: directo 5'GACTGAATATAAACTTGTGGTAGT 3' y reverso 5'CTATTGTTGGATCATATTCGTCC 3'. Las bandas que presentaban un patrón diferente de movilidad fueron secuenciadas en un secuenciador ABI Prism 377 DNA sequencer (PE Applied Biosystems).

5. TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT)

La transcripción reversa es el proceso de síntesis de una hebra de ADN complementaria o copia (ADNc) de una secuencia de ARN determinada. Esta reacción es llevada a cabo por una polimerasa especial capaz de trabajar con cadenas de ribonucleótidos. Tras la síntesis de ese primer ADNc, cuya cadena polisacárida está formada por la desoxiribosa, se puede proceder con una PCR normal, con el uso de una ADN polimerasa.

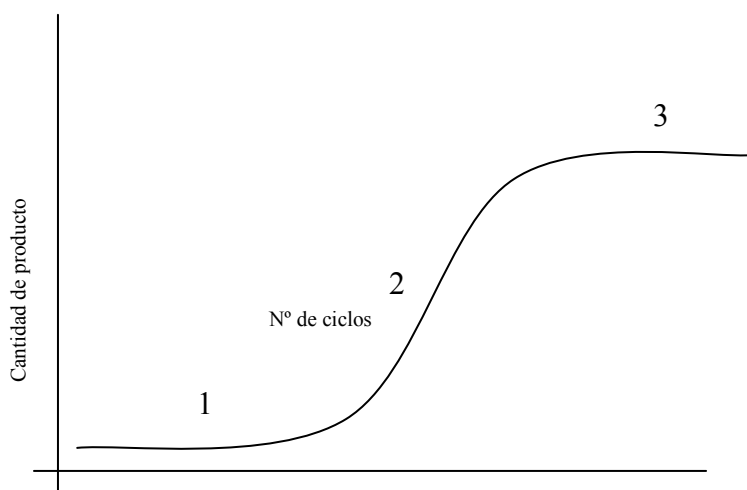
Cuatrocientos µg de ARN total de cada muestra fue retrotranscrito a ADNc mediante el kit *GeneAmp Gold PCR core Kit* (PE Biosystems, Foster City, CA). Este kit usa la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney recombinante (MuLV). El volumen final de la reacción fue de 20 µl por muestra, en los cuales se incluían 15 unidades de la enzima MuLV, 10 unidades de inhibidor de ARNasas, 1 mM de dNTPs (0.25 mM de cada uno de ellos), MgCl₂ 2.5 mM, DTT 10 mM, buffer 1x y cebadores random hexámeros 1.25 µM para retrotranscribir todo el ARN. En el caso de EPR-1 y survivina, dada la amplia complementariedad en la secuencia se hizo un ADNc específico para cada uno de ellos usando los siguientes reversos específicos: para survivina, 5' - TCATCCACCTGAAGTTCACC-3' y para EPR-1: 5' - GCTTCAAGGAGCTGGAAGGC-3'. La síntesis del ADNc se realizó a 42° C durante 20 minutos, precedido de un ciclo de 10 minutos a 25° C. El ADNc así sintetizado fue utilizado en una reacción de PCR a tiempo real.

6. CUANTIFICACIÓN A TIEMPO REAL

Es un método basado en la reacción de PCR en la que en cada uno de los ciclos de amplificación se incorpora un fluoróforo a las nuevas cadenas de ADN sintetizadas, con lo que en cada uno de esos ciclos podemos cuantificar el aumento en fluorescencia y, a través de una serie de equivalencias, la cantidad de ADN de partida. Para el marcaje del ADN hemos optado por el SYBER Green I, un marcador de ADN de doble hebra que se une específicamente al surco estrecho (hendidura secundaria) de la doble hélice de ADN, unión que amplifica en 100 veces su fluorescencia.

Se puede considerar que una reacción de PCR presenta tres fases: una primera en la que los productos de PCR son indetectables, ya que la señal que pudieran emitir está por debajo del umbral de detección de los sistemas utilizados; una segunda fase de crecimiento exponencial, o fase logarítmica donde la eficiencia de amplificación es constante, que abarca desde el momento en que se detectan los productos de PCR hasta que la eficiencia de la polimerasa decae y la reacción se satura, momento en el que se entra en la última de las fases, la denominada fase de meseta (Figura 5).

Figura 5. Fases que componen una reacción de PCR: 1, fase de crecimiento no detectable; 2, fase de crecimiento exponencial; 3, fase de saturación.



Con las técnicas clásicas, la cuantificación se realiza en la fase de meseta, cuando la reacción puede haberse saturado debido a la caída de actividad de la polimerasa, al agotamiento de alguno de los reactivos, o a que los propios productos de PCR compiten, cada vez con más eficiencia, con los cebadores por sus sitios de anillamiento en cada ciclo de PCR. En cualquier caso, la medición puede no ser exacta ya que el producto final que se detecta no solo depende de la cantidad de muestra en la

reacción. En el caso de la cuantificación a tiempo real la medición se realiza en la fase de crecimiento exponencial, fase casi constante donde el curso de la amplificación queda definido por la ecuación: $T_n = T_0 (E)^n$, donde T_n es la cantidad, en el ciclo n , del gen problema que se quiere cuantificar; T_0 es la cantidad inicial de ese gen y E es la eficiencia de la amplificación, la cual varía entre 2, cuando cada copia del producto de PCR es amplificada una vez por ciclo de PCR, hasta 1 donde no existe amplificación de ninguna de las copias. Como es lógico, cuanto más cantidad de nuestro gen problema tengamos inicialmente (ADN, si estamos cuantificando el número de copias genómicas de un alelo, o ADNc, si estamos cuantificando la expresión de un determinado gen) antes se entrará en la fase de crecimiento exponencial.

6.1 Cuantificación relativa a tiempo real con estándar externo

En este tipo de cuantificación la concentración de nuestro gen problema, por ejemplo, se expresa en relación a la concentración, en la misma muestra, de un gen de referencia, el cual se asume que se expresa de manera constante entre los diferentes tipos de muestras. En nuestro estudio, la concentración relativa de los genes problema y los genes de referencia se calcularon por interpolación usando una curva estándar de cada gen generada de diluciones seriadas de ADNc preparado de ARN de un individuo que expresa el gen específico analizado. Finalmente el resultado se ha expresado como el cociente: concentración problema/concentración gen de referencia. La expresión de los niveles del gen problema en un paciente se calcularon como un ratio: valores del gen problema en el tejido tumoral respecto a los valores de ese mismo gen problema en el tejido normal del mismo paciente (T:N) y en las líneas celulares: como los valores del gen problema en la línea celular tratada respecto a los valores de ese mismo gen problema en la misma línea celular no tratada.

6.2. Procedimiento

Se usó la media geométrica de tres genes de referencia, *SDHA* (Subunidad A del complejo succinato deshidrogenasa), *UBC* (Ubiquitina C) y *TBP* (proteína de unión a TATA), para la cuantificación relativa de los distintos genes problema (Vandesompele, De Preter et al. 2002) (Tabla 2).

Las parejas de cebadores para *TAp73*, $\Delta Ex2p73$ y $\Delta Np73$ han sido descritos previamente por otros autores (Concin, Becker et al. 2004), así como los utilizados para

VEGF, denominado en nuestro estudio *VEGF_{total}* y para *PEDF* (Houck, Ferrara et al. 1991; Garcia, Fernandez-Garcia et al. 2004) (Tabla 2).

Las parejas de cebadores para $\Delta Ex2/3p73$, *VEGF*, *VEGF_{165b}*, *MDR1*, *caspasa-1*, *HMGI*, *survivina*, y *EPR-1*, así como las parejas para *E2F-1* y *VDR* que ya han sido descritas (Pena, Garcia et al. 2005; Pena, Garcia et al. 2006; Aguilera, Pena et al. 2007) se diseñaron usando el Primer Express versión 2.0 (Applied Biosystems). En todos los casos el producto amplificado contiene un intrón entre el cebador directo y el reverso para diferenciar posibles contaminaciones con ADN (Tabla 2).

Para *TAp73*, $\Delta Ex2p73$ y $\Delta Ex2/3p73$, los cebadores se diseñaron en las uniones entre exones para amplificar la variante específica. La pareja *TAp73* amplifica todas la isoformas que contengan el dominio de transactivación. El cebador directo para la isoforma $\Delta Np73$ detecta una secuencia única de este transcrito (Tabla 2).

Se usaron tres parejas de cebadores para cuantificar las variantes de *VEGF*. La primera pareja fue diseñada para amplificar todas las isoformas de *VEGF* y es llamada de aquí en adelante *VEGF_{total}*. El segundo par de cebadores amplifican las formas que contienen el exón 8 y que muestran propiedades angiogénicas y se nombra en este trabajo como *VEGF*. Y por último, los diseñados para amplificar la variante antiangiogénica se denomina *VEGF_{165b}* (Tabla 2).

La especificidad de cada par de cebadores se confirmó por la curva de disociación de los productos de PCR, temperatura a la que se encuentran desnaturalizadas la mitad de las bases de un amplicón específico, además de cargar los productos de PCR en geles de poliacrilamida no desnaturalizante al 8% junto con un marcador de peso molecular, para comprobar que se correspondían con los fragmentos esperados, y de secuenciar las diferentes bandas en un secuenciador ABI Prism 377 DNA (PE Applied Biosystems).

Las PCRs se llevaron a cabo en un Light-Cycler (Roche Diagnostics) usando el kit LightCycler-FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I (Roche Diagnostics). El volumen final de cada reacción fue de 20 μ l en los que se incluían: 4 μ l de los productos de RT, 0.5 μ M de cada uno de los cebadores directo y reverso para cada uno de los fragmentos, una concentración variable de dimetil sulfoxido (Tabla 2), así como un 1x de la mezcla de reacción que contenía la polimerasa FastStart DNA, buffer de reacción, dNTPs, MgCl₂ y SYBR Green I.

El proceso consta de un primer paso de desnaturalización a 95°C durante 10 minutos. A continuación entre 35 y 45 ciclos que contenían a su vez un paso de

desnaturalización de 0 segundos a 95°C, un paso de anillamiento de cebadores durante 5 segundos a distintas temperaturas dependiendo del amplicón (Tabla 2) y un último paso de elongación a 72°C durante otros 5 segundos, al final de los cuales se realiza la adquisición de fluorescencia. Las reacciones se llevaban a cabo en capilares de cristal muy finos que permiten la transmisión de la temperatura por toda la muestra de manera casi instantánea, por lo que los tiempos de incubación son muy cortos y el tiempo transcurrido entre la transición de 72°C de la elongación hasta los 94°C de la desnaturalización es suficiente para la desnaturalización de todos los fragmentos.

Para realizar la curva patrón se utilizaron 4 diluciones seriadas distintas según el gen diana de estudio, de un ARN extraído de muestras positivo para el gen analizado. A la primera de las diluciones se le asignaba un valor arbitrario para la expresión de cada uno de los genes que se iban a cuantificar y las restantes correspondían cada una al valor de la dilución correspondiente. En un determinado ciclo, los productos de PCR de cada una de estas diluciones, empiezan a ser detectados marcando así un punto determinado que junto con los valores arbitrarios asignados a cada uno de ellos establecen una recta patrón. En esta recta se extrapolan los puntos marcados por los ciclos a los que comienzan a ser detectadas las diferentes muestras obteniéndose una primera aproximación de la concentración de partida del gen problema. En el estudio de los niveles del ARNm de estos genes, las concentraciones obtenidas se normalizan con la media geométrica de las concentraciones para cada gen de referencia según la fórmula: $\text{expresión del gen diana} / \text{media geométrica de la expresión de los tres genes de referencia}$, con lo que obtenemos ya un valor de expresión relativa, es decir, conocemos los niveles de ARNm del gen diana en relación a los niveles de ARNm de los genes de referencia, que como ya se mencionó, se asume que son constantes entre las diferentes muestras. En el caso de las muestras de los pacientes, el cociente de los valores obtenidos en el tejido tumoral y normal de cada individuo nos indicará cuantas veces más o menos es expresado nuestro gen problema en el tejido tumoral con respecto al normal. Y en el caso de las líneas celulares, el cociente entre las tratadas y no tratadas nos indica cuantas veces más o menos es expresado nuestro gen problema en las líneas tratadas respecto de las líneas no tratadas.

Tabla 2: Secuencias de los cebadores utilizados, tamaño del amplicón (pb), cantidad de DMSO usado en % y temperaturas de anillamiento para la amplificación de los ADNc estudiados.

Locus	Secuencia	pb	DMSO %	T°
SDHA	5'-TGGGAACAAGAGGGCATCTG-3'D 5'-CCACCACTGCATCAAATTCATG-3'R	86	NO	59°C
UBC	5'-ATTTGGGTCGCGTTCTTG-3'D 5'-TGCCTTGACATTCTCGATGGT-3'R	133	NO	59°C
TBP	5'-TCTGGGATTGTACCGCAGC-3'D 5'-CGAAGTGCAATGGTCTTTAGG-3'R	83	NO	59°C
TAp73	5'-GCACCACGTTTGAGCACCTCT-3'D 5'-GCAGATTGAACTGGGCCAATGA-3'R	167	NO	68°C
ΔEx2p73	5'-GACGCCTGCAGGGAACCAGA-3'D 5'-TGCCCTCCAGGTGGAAGACG-3'R	115	NO	60°C
ΔEx2/3p73	5'-GCGACGGCTGCAGGCCAGT-3'D 5'-TCGGTGTGGAGGGGATGACA-3'R	186	2	68°C
ΔNp73	5'-CAAACGGCCCGCATGTTCCC-3'D 5'-TTGAAGCTGGGCCGTGGCGAG-3'R	231	2	68°C
E2F-1	5'-CAAGAAGTCCAAGAACCACATCC-3'D 5'-AGATATTCATCAGGTGGTCCAGC-3'R	137	NO	68°C
VEGF _{total}	5'-CACTGAGGAGTCCAACATCACC-3'D 5'-CTGCATTACATTTGTTGTG-3'R	105	NO	65°C
VEGF	5'-GATCCGCAGACGTGTAAATGTTT-3'D 5'-TCACCGCCTCGGCTTGTCACAT-3'R	106	NO	64°C
VEGF _{165b}	5'-GAGATGAGCTTCCTACAGCAC-3'D 5'-TTAAGCTTTCAGTCTTTCCTGGTGAGAGATCTGCA-3'R	103	NO	65°C
PEDF	5'-AATCCATCATTCACCGGGC-3'D 5'-ACAAAGCTGGATTTTATGCGC-3'R	163	5	63°C
Survivina	5'-AGATGACGACCCCATAGAGG-3'D 5'-ATTGTTGGTTTCCTTTGCAATTTTG-3'R	151	NO	63°C
EPR-1	5'-CAGTTTCAAAAATTCACCAAGGG-3'D 5'-AGATGACGACCCCATAGAGG-3'R	106	NO	63°C
VDR	5'-TTGCCATACTGCTGGACGC-3'D 5'-GGCTCCCTCCACCATCATT-3'R	106	NO	60°C
MDR-1	5'-CTATGCATCTTATGCTCTGGCC-3'D 5'-CCTGTCCAACACTAAAAGCCC-3'R	125	NO	67°C
HMG-1	5'-ACCCAGATGCTTCAGTCAACTTC-3'D 5'-TGCCATATCTTCAAATTTTCCTTTC-3'R	101	NO	58°C
caspasa-1	5'-AGTTACCTGGCAGGGACGCT-3'D 5'-TGGAAGGAAGAAAGTACTCCTTGA-3'R	96	NO	62°C

7. TRATAMIENTO CON VITAMINA D

Las células MCF7, MDA-MB-453 y SW480-ADH fueron tratadas con 10^{-7} M de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Sigma, St. Louis, MO) o la concentración correspondiente de vehículo/isopropanol durante 48 horas. Los experimentos se llevaron a cabo en medio suplementado con suero fetal bovino tratado previamente con carbono vegetal para eliminar las posibles hormonas liposolubles.

8. TRANSFECCIONES TRANSITORIAS

Las células SW480-ADH, MDA-MB-453, MCF7, H1299, HCT116 y 293T se sembraron en triplicado y fueron transfectadas de manera transitoria con el plásmido MIEG3 vacío o que contenía la secuencia que codifica para survivina (proporcionado por el Dr. S Fukuda, The Walther Oncology Center, Indiana University School of Medicine, Indianapolis). Las transfecciones se realizaron utilizando Lipofectamine 2000 (Invitrogen Corp.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A las 18, 24 y 48 h después de la transfección se aislaron el ARN y las proteínas de estas células.

9. INMUNOHISTOQUIMICA DE p53, VEGF Y VEGF_{165b}

La inmunohistoquímica se basa en la utilización de un anticuerpo específico, previamente marcado con una enzima que se puede transformar en sustrato visible unido por un enlace químico al anticuerpo, que no afecta la unión del anticuerpo a su antígeno. Este anticuerpo se aplica a una muestra de tejido orgánico, fijado en parafina. El complejo antígeno-anticuerpo, mediante la utilización de técnicas específicas (ejemplo: peroxida, fluoresceína, etc...), permite su localización e identificación en las muestras a estudiar.

El análisis genotípico de p53 se realizó a través del estudio de la detección y localización de su proteína por inmunohistoquímica. Esta fue realizada de acuerdo a procedimientos estándares, con una incubación toda la noche en presencia del anticuerpo monoclonal cl1801 de ratón (Oncogenes Sciences, Manhasset, NY). La inmunodetección se realizó con la técnica Streptavidina-Biotina Peroxidasa (LSA; DAKO) usando el cromógeno diaminobenzidina como sustrato. Todas la inmunotinciones se realizaron usando el dispositivo de inmunotinción automático TechMate 500 (DAKO). El anticuerpo monoclonal de ratón cl1801 fue elegido por su habilidad para detectar más del 89% de las mutaciones puntuales de p53 (Sjogren, Inganas et al. 1996). Las muestras de tejido que tenían una tinción en más del 10% de las células epiteliales en el núcleo o en el núcleo y el citoplasma fueron consideradas positivas para p53. Los casos que no exhibían tinción nuclear fueron considerados negativos.

Las inmunohistoquímicas de VEGF y VEGF_{165b} fueron realizadas de acuerdo a procedimientos estándares, con una incubación toda la noche con sus respectivos anticuerpos. Para VEGF se uso un anticuerpo monoclonal de ratón cuyo epítipo reconoce la región amino terminal, concretamente los aminoácidos del 14 al 124 (Abcam, Cambridge Science Park, Cambridge, Reino Unido) en una dilución 1/100. Este anticuerpo reconoce las variantes VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆. Para VEGF_{165b} se uso un anticuerpo monoclonal de ratón (MRVL56/1, Abcam) en una dilución 1/ 100, desarrollado contra el exón 8b que solo lo contienen las isoformas VEGF_{xxx}b.

Las inmuno-detecciones se realizaron con la técnica Streptavidina-Biotina Peroxidasa (LSA; DAKO) usando el cromógeno diaminobenzidina como sustrato. Todas la inmunotinciones se realizaron usando el dispositivo de inmunotinción automático TechMate 500 (DAKO). Para la tinción de VEGF, las secciones fueron

previamente calentadas por microondas en citrato trisódico 10 mM (pH 6.0) para desenmascarar el antígeno.

10. EXTRACCIÓN PROTEICA. INMUNOTRASFERENCIA

Las células se lisaron en PBS que contenía 50 mmol/L de Tris-HCl a pH 7.4, 250 mmol/L de cloruro de sodio, 5 mmol/L de EDTA, 50 mmol/L de fluoruro sodio, 0,5% de detergente Nonidet P-40 y un coctel de inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics). Los extractos celulares fueron centrifugados a 14000rpm durante 20 minutos para eliminar el resto de componentes no proteicos. Por otro lado los tejidos de los pacientes fueron disgregados con el dispositivo MagNa Lyser (Roche Diagnostics) antes de ser lisados igualmente para la extracción de las proteínas. La concentración de proteínas se determinó mediante el espectrofotómetro NanoDrop.

La inmunotransferencia es un método utilizado para la detección y cuantificación de proteínas en una muestra de un tejido homogeneizado o extracto y se basa en la electroforesis en gel para separar proteínas desnaturalizadas por su masa molecular. Las proteínas son transferidas posteriormente desde el gel hacia una membrana de nitrocelulosa o PVC donde son detectadas utilizando anticuerpos específicos para la proteína de interés.

Cuarenta microgramos de proteína total se desnaturalizaron en un buffer 2x de SDS a 95°C y, separados por peso molecular mediante una electroforesis en gel desnaturalizante de SDS-poliacrilamida al 10% y transferidas a membranas de nitrocelulosa (Biorad laboratorios SA, Madrid, España). Las membranas se bloquearon durante 1 hora y se incubaron con los respectivos anticuerpos primarios toda la noche a 4°C, después se realizaron varios lavados con PBS-tween y se incubaron durante una hora con el correspondiente anticuerpo secundario a temperatura ambiente, seguido de varios lavados con PBS-tween al 1%. Todos estos pasos se realizan en agitación. Las proteínas fueron detectadas y cuantificadas por densitometría de banda, utilizando el sistema de imagen Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR biosciences, Cambridge, UK). Utilizamos un anticuerpo de conejo policlonal contra survivina (NB-500-201, Novus Biologicals, Littleton, CO) y β -actina (ab8227, Abcam) y un anticuerpo monoclonal de ratón contra TAp73 (ab11996, Abcam) en una gama de diluciones de 1:1000 a 1:2000. Para la detección de Δ Np73, se utilizaron distintos anticuerpos monoclonales de ratón, OP181 (Calbiochem, San Diego, CA), ab11997 (Abcam), ab13649 (Abcam), NB-100-56538 (Novus Biologicals) y AB-4 (Neomarkers Inc, Fremont, CA) en una dilución de 1:100. Anticuerpos anti-conejo y anti-raton se utilizaron como anticuerpos secundarios con marcaje en infrarrojos a 680 y 800 en una

dilución 1:15000 (LI-COR Biosciences) para la detección en la misma membrana de la proteína de interés y el control de carga (β -actina).

11. ENSAYO DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA

Esta técnica bioquímica permite identificar la presencia de proteínas (histonas modificadas, factores de transcripción y proteínas cromosómicas no-histonas) unidas directa o indirectamente al ADN. Se basa en el entrecruzamiento con formaldehído y la inmunoprecipitación de los complejos cromatínicos resultantes. Se utiliza el formaldehído para establecer enlaces covalentes entre las proteínas y las secuencias de ADN adyacentes. La cromatina entrecruzada es sonicada para conseguir los tamaños deseados de ADN (500-1000 pb). Los fragmentos de ADN y los complejos de proteínas de interés unidos a éstos son inmunoprecipitados con anticuerpos contra las proteínas que presuntamente se encuentran entrecruzadas con nuestro fragmento de ADN. Los fragmentos de cromatina inmunoprecipitada se pueden examinar por PCR con cebadores específicos (Weinmann and Farnham 2002; Wells and Farnham 2002).

Se realizó este ensayo para evaluar si los cambios observados en los niveles de expresión de las isoformas de *p73* al transfectar las células con survivina respecto a la transfección con el vector vacío se debían a cambios a nivel epigenético mediados por esta. Tras la transfección se llevó a cabo una fijación con formaldehído al 1% durante 15 minutos en agitación a temperatura ambiente para conservar las posibles interacciones que pudieran existir entre las proteínas y el ADN. Esta reacción de fijación se paró a los 15 minutos mediante la adición de glicina a una concentración final de 0,15 M durante un mínimo de 5 minutos. Después, se realizaron dos lavados con PBS a 4°C complementado con un cóctel de inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics). Las células fueron raspadas de las placas y resuspendidas en el buffer de lisis SDS también complementado con los inhibidores de proteasas (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8.1). Tras una incubación en hielo durante 10 minutos, las células se sonicaron para obtener el ADN en fragmentos de tamaños comprendidos entre 500pb y 1000pb. Posteriormente con el fin de eliminar los residuos celulares se procedió a centrifugar las muestras a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Los sobrenadantes, conteniendo los fragmentos de cromatina solubles, se transfirieron a nuevos tubos, y se determinó su concentración de ADN con un NanoDrop ND-1000. Cantidades equivalentes de muestra se diluyeron en el buffer de dilución ChIP (0,01% SDS, 1% Tritón X-100, 2 mM EDTA, 16,7 mM Tris-HCl pH 8.1 y 167 mM NaCl) complementado con los inhibidores de proteasas y microesferas de agarosa que llevan

unido la proteína A/ ADN de esperma de salmón, que muestra afinidad por las regiones constantes de la cadena pesada de los anticuerpos (Upstate Biotechnology, Inc., Lake Placid, NY) para eliminar las posibles moléculas de las muestras que no estén relacionadas con nuestro estudio. Por centrifugación se eliminan estas microesferas de agarosa, y el sobrenadante se divide para ser incubado durante la noche en rotación a 4°C con los siguientes anticuerpos:

- La muestra usada como control negativo, que no se incubaba con ningún anticuerpo.
- Anticuerpo contra la trimetilación de la lisina 4 de la histona 3, H3K43met (CSP-003-050, Diagenode Inc, Sparta, NJ, 8 µl).
- Anticuerpo contra la acetilación de la lisina 16 de la histona 4, H4K16 (39167, Active Motif, Inc., Carlsbad, CA, 4 µl).
- Anticuerpo contra la histona 3, H3 total (ab1791, Abcam, 4 µl)

Después de la incubación se añaden a cada muestra las microesferas de agarosa y se incuban durante 1 hora a 4°C, esto permite su unión a las inmunoglobulinas que a su vez pueden haber unido o no el ADN. Estas uniones fueron recogidas por centrifugación, junto a las microesferas de agarosa. El sobrenadante corresponde a la cantidad de ADN no unida a las proteínas de estudio, una parte de este sobrenadante se reservó para la extracción de su ADN como posible control de la precipitación específica de los promotores de *p73* y que se reservó para extraer el ADN por el mismo procedimiento que el resto de la muestra unida a las microesferas. Este ADN se usó para poner a punto los cebadores para el análisis de los promotores de *p73*.

El sedimento con los inmunocomplejos formados por fragmentos de cromatina-anticuerpo-microesferas de agarosa fueron lavados secuencialmente con distintas soluciones para romper el enlace covalente entre las microesferas y los anticuerpos y así poder recuperar el ADN. Los lavados se llevaron a cabo con un tampón de baja salinidad (20 mM Tris_HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100 y 0,1% SDS), un segundo tampón de alta salinidad (20 mM Tris_HCl, pH 8, 500 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100 y 0,1% SDS), otro lavado con tampón de cloruro de litio (10 mM Tris_HCl, pH 8, 0,25 M LiCl, 1% desoxicolato y 1% NP-40) y finalmente dos lavados con el tampón TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8). De las microesferas de agarosa se eluyó la cromatina mediante dos lavados consecutivos de estas con el tampón de elución (100 mM NaHSO₃, 1% SDS). Posteriormente para revertir la unión provocada por el formaldehído de las proteínas al ADN se añadió

cloruro sódico a una concentración de 5 M y se dejó durante 4 horas a 65°C en agitación. El ADN fue extraído con doble precipitación con fenol/cloroformo. De cada uno de los experimentos se realizaron triplicados independientes. Además se extrajo el ARN de una alícuota guardada para ese fin después de la fijación con formaldehído con el kit FFPE (Quiagen) y se llevó a cabo una cuantificación a tiempo real de survivina y las distintas variantes de *p73* para confirmar que el proceso de transfección había funcionado correctamente.

11.1 Análisis del ADN inmunoprecipitado

Para determinar si la fracción de cromatina inmunoprecipitada con los diferentes anticuerpos contenía a los promotores de *p73*, se analizó la presencia de estos por PCR a tiempo real utilizando los cebadores y condiciones que aparecen en la tabla 3. Además se usó *GAPDH* para normalizar su expresión (Tabla 3). Todos ellos fueron amplificados a 60°C durante 40 ciclos en el equipo de PCR de Applied Biosystem modelo ABI 7900. Cada cuantificación fue realizada por triplicado.

Tabla 3: Parejas de oligos utilizadas para el análisis de la secuencias de los promotores de *p73* y para *GAPDH*

	Promotor 1			
	D	R	amplicón	DMSO
Pareja 1	5'-GTGGCTCCACAGGAGAAGTG-3'	5'GCCCATCTTTCCTGACACC3'	221bp	2%
	Promotor 2			
Pareja 2	5'-GAACAGAGGCTGCTTTACGG-3'	5'-CCCACCCCTTTATTCCTCAT-3'	222bp	No
	GAPDH			
Pareja 3	5'-GACTCACCCTGCCCTCAATA-3'	5'-AAAGGCACTCCTTGGAACCT-3'	195bp	No

12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se comprobó mediante pruebas de normalidad (test de Kolmogorov-Smirnov) si las variables de las medidas de expresión génica, ratio entre tejido tumoral y tejido normal (T/N) se correspondían con una distribución normal. Estos datos no seguían una distribución normal y fueron normalizados mediante la aplicación de \log_{10} . Tras este procedimiento los datos correspondientes a los niveles de *E2F-1* fueron los únicos que no se ajustaron a una distribución normal y para su análisis se utilizó el coeficiente de correlación de Kruskal-Wallis, mientras que para el resto de los datos analizados se usó el test de Spearman. Para el análisis de la comparación entre tratamientos en las líneas celulares se utilizó el test de la t de Student.

Las variables analizadas para el estudio de las posibles relaciones existentes entre los distintos parámetros clínico-patológicos y la expresión de los distintos genes analizados en este trabajo se contrastaron con el test de ANOVA.

Para determinar si alguna de las variables podía predecir la supervivencia de los pacientes se realizó un estudio univariante. La distribución de la supervivencia fue estimada con el producto de los límites de Kaplan-Meier. El análisis multivariante se llevó a cabo con el modelo de Cox, para identificar los factores involucrados de manera independiente en el pronóstico de los pacientes. El riesgo relativo para todos los factores fue calculado con intervalos de confianza (IC) de 95%.

En todos los tipos de análisis se consideraron valores significativos (p) inferiores a 0,05 en contrastes a dos colas. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa SPSS versión 14.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

RESULTADOS

1. ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE LAS DISTINTAS ISOFORMAS DE $p73$ EN CÁNCER DE COLON Y CÁNCER DE MAMA

1.1 Coexpresión de las isoformas de $p73$ en tumores de colon y mama

Se examinaron los niveles de ARNm de cada variante en el tejido tumoral y en su correspondiente tejido normal de pacientes diagnosticados con cáncer de colon y mama. La media, valores mínimo y máximo, así como los percentiles 25 y 75 para la expresión de $\Delta Ex2p73$, $\Delta Ex2/3p73$, $\Delta Np73$, y $TAp73$ se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Media, mínimo, máximo y percentiles 25 y 75 de los niveles de expresión de $\Delta Ex2p73$, $\Delta Ex2/3p73$, $\Delta Np73$, $TAp73$ y $E2F-1$ para la muestras de cáncer de colon y cáncer de mama.

	$\Delta Ex2p73$	$\Delta Ex2/3p73$	$\Delta Np73$	$TAp73$	$E2F-1$
Cáncer colon					
Media	0.21	0.34	0.17	0.64	1.47
Máximo	284.4	1188.4	419.75	425.1	2408.7
Mínimo	0.0013	0.0002	0.00001	0.0007	0.00001
Percentiles					
25	0.05	0.06	0.03	0.11	0.43
75	1.17	7.31	2.11	3.6	5.97
Cáncer de mama					
Media	0.56	0.56	0.51	0.51	3.61
Máximo	155.64	171.35	119.1	847.7	4784.15
Mínimo	0.0036	0.0014	0.0038	0.0001	0.00001
Percentiles					
25	0.15	0.22	0.18	0.08	0.18
75	2.1	2.4	2.52	10.72	261.04

Aproximadamente un 30% de los casos de cáncer de colon y de mama presentaban sobreexpresión tanto de las isoformas oncogénicas como de las supresoras de $p73$ (al menos niveles dos veces más altos en el tejido tumoral respecto al normal). Se observó una correlación directa estadísticamente significativa entre los niveles de expresión de todas las isoformas de $p73$ en las muestras de cáncer de colon y mama (Tabla 5), lo que indica que los niveles de expresión de las variantes de $p73$ varían en paralelo en los tejidos tumorales. En las muestras de mama se observó una clara tendencia entre los niveles de expresión de $\Delta Ex2/3p73$ y $TAp73$, aunque no alcanzó significación estadística (Tabla 5). Aunque estadísticamente significativas, las correlaciones más débiles observadas fueron entre $\Delta Ex2/3p73$ y $TAp73$ en muestras de

carcinomas de colon y entre *TAp73* y *ΔEx2p73*, y *TAp73* y *ΔNp73* en muestras de carcinomas de mama (Tabla 5). Si bien *ΔNp73* surge del segundo promotor alternativo de *p73*, sus niveles de expresión muestran una fuerte correlación con la expresión de las isoformas del primer promotor de *p73*.

Tabla 5. Correlaciones entre los niveles de expresión de todas las isoformas de *p73*, y los niveles de E2F-1 en los casos de carcinoma de colon y mama

	<i>ΔEx2/3p73</i>		<i>ΔNp73</i>		<i>TAp73</i>		<i>E2F-1</i>	
	<i>p</i>	Coefficiente	<i>p</i>	Coefficiente	<i>P</i>	Coefficiente	<i>p</i>	Coefficiente
Colon								
<i>ΔEx2p73</i>	< 0.0001	0.550	< 0.0001	0.647	< 0.0001	0.339	0.009	0.26‡
<i>ΔEx2/3p73</i>			< 0.0001	0.539	0.021	0.218	0.8	0.02‡
<i>ΔNp73</i>					0.005	0.263	0.9	0.005‡
<i>TAp73</i>							0.036	0.20‡
Mama								
<i>ΔEx2p73</i>	< 0.0001	0.818	< 0.0001	0.820	0.031	0.279	0.05	0.26
<i>ΔEx2/3p73</i>			< 0.0001	0.811	0.119	0.269	0.05	0.33
<i>ΔNp73</i>					0.019	0.303	0.19	0.17
<i>TAp73</i>							0.001	0.43

La *p* se calculó por el análisis de varianza (ANOVA). Entre paréntesis se muestran los coeficientes de Pearson o Spearman‡.

1.2 Asociación entre el estatus de *p53* y *p73*

Alteraciones redundantes que afectan a la misma vía no deben conferir ninguna ventaja extra al crecimiento de las células tumorales, por lo que, mutaciones en *p53* y sobreexpresión de las isoformas oncogénicas de *p73* podrían ser mutuamente excluyentes si aceptamos que las isoformas oncogénicas de *p73* inactivan la vía supresora tumoral de *p53*. Inmunotinción nuclear o nuclear y citoplásmica de *p53*, sugestivo de mutación en su secuencia, se observó en 81 de los 113 pacientes de colon (72%) y en 23 de las 60 pacientes de mama (38%). En los casos de cáncer de colon, se encontró una asociación entre tinción negativa para *p53* y la sobreexpresión de *ΔEx2p73* (*p* = 0.05) y *TAp73* (*p* = 0.05) (Tabla 6). Las medias geométricas para los niveles de *ΔEx2p73* fueron 0,5 cuando la tinción era negativa para *p53* y 0,1 cuando la tinción era positiva. Para los niveles de expresión de *TAp73*, las medias geométricas fueron 1,3 para la tinción negativa para *p53* y 0,4 para la positiva. Esta asociación no se encontró para las formas *ΔEx2/3p73* y *ΔNp73*. Cuando los casos fueron divididos en terciles en función de los niveles de expresión de las distintas variantes de *p73*, observamos que 17 de los 18 (94%) pacientes con la menor expresión de *ΔEx2p73* y *TAp73* (primer tercil) mostraban tinción positiva para *p53*, mientras que 23 de los 36 (64%) pacientes con

altos niveles de expresión para $\Delta Ex2p73$ y/o $TAp73$ (tercer tercil) tenían tinción positiva ($p = 0.02$). Además, solo el 43% de los pacientes que exhiben una alta expresión de $\Delta Ex2p73$ y baja expresión de $TAp73$ muestran tinción positiva para p53 comparado con el 78% de individuos con menores niveles de $\Delta Ex2p73$ y alta expresión de $TAp73$. Esta última asociación no alcanza significación estadística probablemente debido al reducido número de pacientes en cada subgrupo. En cuanto a la serie de cáncer de mama, se encontró también una asociación estadística entre p53 nativo, no mutado, y la sobreexpresión de la variante $\Delta Np73$ ($p = 0.04$), con medias geométricas de 1,4 y 0,3 para la tinción negativa y positiva para p53, respectivamente (Tabla 7). Aunque no fue estadísticamente significativa, la misma asociación fue también observada para el resto de isoformas truncadas para el dominio de transactivación, tendencia que fue mucho menos evidente para la isoforma $TAp73$.

1.3 Cooperación de las isoformas de p73 y K-ras oncogénico en tumorigénesis

$\Delta Np73$ ha sido clasificada como una proteína immortalizante que coopera con ras oncogénico en la transformación de fibroblastos primarios in vitro (Petrenko, Zaika et al. 2003). En el estudio correlativo en los paciente con cáncer de colon esperamos encontrar alta tasa de individuos en los que niveles elevados de expresión de $\Delta Np73$ coinciden con *K-ras* mutado, lo que sugeriría la selección de células que albergan ambas alteraciones durante el proceso tumorigénico en humanos. Mutaciones de *K-ras* en los codones 12 o 13 se observaron en 34 de los 113 pacientes con cáncer de colon (30%). Nuestros resultados no mostraron ninguna asociación estadística entre sobreexpresión de $\Delta Np73$ y presencia de *K-ras* mutado. Tampoco se encontró ninguna asociación entre las restantes isoformas de *p73* y las mutaciones oncogénicas en *K-ras* (Tabla 6).

1.4 Inducción de las isoformas de p73 por E2F-1

Se ha descrito que E2F1 puede activar in vitro la transcripción de las isoformas de *p73* (Stiewe, Zimmermann et al. 2002; Putzer, Tuve et al. 2003). Además, las isoformas oncogénicas de *p73* podrían inducir la activación de E2F a través de la hiperfosforilación de la proteína del retinoblastoma (pRb) (Stiewe, Stanelle et al. 2003). Nosotros hemos analizado si los niveles de las formas $\Delta TAp73$ y de *E2F-1* se correlacionaban en nuestra serie de cáncer de colon y mama. La mediana, valores

mínimo y máximo, y percentiles 25 y 75 para la expresión de *E2F-1* se muestran en la tabla 4. Se encontró una correlación directa entre la expresión de *E2F-1* y los niveles de $\Delta Ex2p73$ ($p=0.009$, $r = 0.26$) y $TAp73$ ($p = 0.036$, $r = 0.20$) en los pacientes con cáncer de colon (Tabla 5). En los casos de cáncer de mama, pudimos observar correlaciones directas entre la expresión de *E2F-1* y los niveles de $\Delta Ex2p73$ ($p=0.05$, $r = 0.26$), $\Delta Ex2/3p73$ ($p=0.05$, $r = 0.33$), y $TAp73$ ($p = 0.001$, $r = 0.43$) (Tabla 5).

1.5 Asociación de la expresión de las distintas isoformas de p73 con los datos patológicos de los tumores de colon

El análisis de la relación entre la expresión de las isoformas de *p73* y los datos patológicos de los tumores reveló algunas asociaciones significativas en los pacientes con cáncer de colon (Tabla 6). Observamos una asociación entre el estadio tumoral y los niveles de expresión de las isoformas $\Delta Ex2/3 p73$ y $\Delta Np73$. La expresión de $\Delta Ex2/3p73$ era significativamente mayor en el estadio IV ($p = 0.03$), con medias geométricas de 0,38 para estadio I, 0,35 para estadio II, 0,36 para estadio III y 25,55 para estadio IV (Figura 6A). Los niveles de $\Delta Np73$ aumentaban significativamente en paralelo con el estadio ($p = 0.011$), como se aprecia por la media geométrica de su expresión (0,06 en estadio I, 0,19 en estadio II, 0,46 en estadio III y 11.12 en estadio IV) (Figura 6B).

Además, se encontró una asociación entre la presencia de pólipos en la pieza quirúrgica y sobreexpresión de $\Delta Ex2p73$ ($p = 0.03$), $\Delta Ex2/3 p73$ ($p = 0.04$) y $TAp73$ ($p = 0.01$). La media geométrica de la expresión en pacientes con ausencia (71,7%) y presencia (28,3%) de pólipos fue 0,17 y 0,45 para $\Delta Ex2p73$, 0,3 y 1,28 para $\Delta Ex2/3p73$ y 0,4 y 1,7 para $TAp73$, respectivamente.

La sobreexpresión de $\Delta Np73$ se asoció significativamente con invasión vascular ($p = 0.02$). La media geométrica de los niveles de $\Delta Np73$ de los 68 de 113 pacientes con cáncer de colon (60,2%) que no mostraron invasión vascular fue de 0,14; el restante 39,8% con invasión vascular presentaba una media geométrica de la expresión de 0,65.

La presencia de afectación ganglionar se asoció con niveles de expresión altos de la variante $\Delta Ex2/3p73$ ($p = 0.04$). La media geométrica de los niveles de expresión de esta isoforma de los 37 de 113 pacientes con cáncer de colon (32.75%) que mostraron afectación ganglionar fue de 1,7; el restante 67.25% que no mostraron afectación ganglionar presentaba una media geométrica de expresión de 0,4.

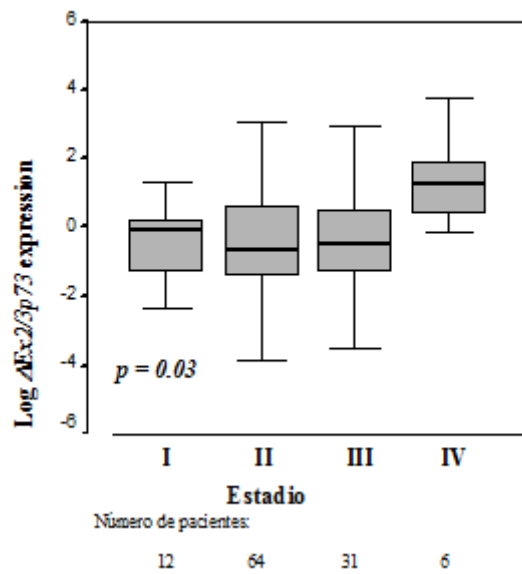
Se observó una asociación entre la localización del tumor y sobreexpresión de la variante *TAp73* ($p = 0,004$). La media geométrica de los niveles de *TAp73* fue de 0,62, 0,22 y 1,8 para colon izquierdo, derecho y recto, respectivamente. Además, también se encontró una tendencia entre la localización en recto y sobreexpresión de la isoforma $\Delta Ex2p73$ ($p = 0,06$). La media geométrica de niveles de $\Delta Ex2p73$ para colon izquierdo, derecho y recto fue 0,17, 0,16 y 0,52, respectivamente.

Tabla 6. Asociaciones entre los niveles de expresión de las isoformas de *p73* (columnas) y las características moleculares y patológicas de nuestra serie de cáncer de colon (filas). Media geom., media geométrica de los niveles de expresión. La *p* se calculó por el análisis de varianza (ANOVA).

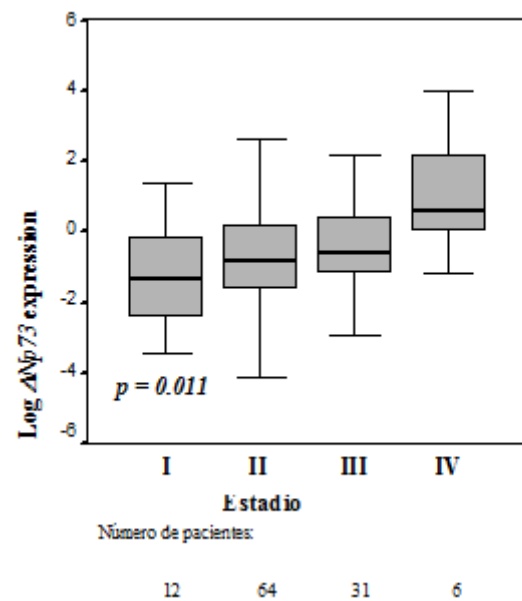
Características serie de colon		Total (%)	Media geom. $\Delta Ex2p73$	<i>p</i>	Media geom. $\Delta Ex2/3p73$	<i>p</i>	Media geom. $\Delta Np73$	<i>p</i>	Media geom. $\Delta Ap73$	<i>p</i>
Pacientes		113	113		113		113		113	
Edad media		70.5±10.8								
Sexo										
	Hombre	61 (54%)	0.14	0.26	0.26	0.5	0.1	0.3	0.41	0.86
	Mujer	52 (46%)	0.24		0.42		0.24		0.45	
Localización										
	Izquierda	47 (41.6%)	0.17		0.36		0.14		0.62	
	Derecha	37 (32.7%)	0.16	0.06	0.44	0.2	0.34	0.28	0.22	0.004
	Recto	29 (25.7%)	0.52		1.5		0.5		1.8	
Estadio tumoral										
	I	12 (10.6%)	0.19		0.38		0.06		0.32	
	II	64 (56.6%)	0.21	0.7	0.35	0.03	0.19	0.011	0.65	0.8
	III	31 (27.4%)	0.26		0.36		0.46		0.65	
	IV	6 (5.4%)	0.65		25.55		11.12		0.97	
Invasión vascular										
	No	68 (60.2%)	0.23	0.9	0.44	0.4	0.14	0.02	0.7	0.5
	Si	45 (39.8%)	0.24		0.78		0.65		0.5	
Pólipos										
	No	81 (71.7%)	0.17	0.03	0.3	0.04	0.18	0.13	0.4	0.01
	Si	32 (28.3%)	0.45		1.28		0.6		1.7	
Afectación ganglionar										
	Negativa	76 (67.25%)	0.2	0.3	0.4	0.04	0.2	0.2	0.63	0.9
	Positiva	37 (32.75%)	0.32		1.7		0.47		0.6	
Diferenciación tumoral										
	Bien	68 (60.2%)	0.23		0.35		0.21		0.5	
	Moderado	38 (33.6%)	0.28	0.7	1.2	0.26	0.41	0.6	1.1	0.16
	Poco	7 (6.2%)	0.15		0.56		0.16		0.16	
p53										
	Negativo	32 (28%)	0.5	0.05	0.44	0.5	0.26	0.8	1.3	0.05
	Positivo	81 (72%)	0.1		0.68		0.29		0.4	
K-ras										
	Negativo	79 (70%)	0.26	0.8	0.75	0.3	0.27	0.8	0.6	0.6
	Positivo	34 (30%)	0.23		0.36		0.31		0.75	

Figura 6. Diagrama de cajas: Asociación entre los niveles de expresión de las variantes $\Delta Ex2/3p73$ (A) y $\Delta Np73$ (B) y el estadio tumoral en los pacientes de cáncer de colon. Los datos de las isoformas de p73 fueron normalizados usando la transformación \log_{10} . La altura de las cajas es igual al recorrido intercuartílico.

A



B



1.6 Asociación de la expresión de las distintas isoformas de p73 con los datos patológicos de los carcinomas de mama

El análisis de la relación entre los niveles de expresión de las variantes de *p73* y los datos patológicos reveló importantes asociaciones en la serie de mama (Tabla 7). Se observó una asociación estadística entre invasión vascular y sobreexpresión de $\Delta Ex2p73$ ($p = 0,05$). La media geométrica de los niveles de $\Delta Ex2p73$ para los pacientes que presentaban invasión vascular (41,7%) fue 0,9 y para los pacientes sin esta característica patológica fue 0,3. También se encontró una tendencia entre la sobreexpresión de $\Delta Np73$ y la invasión vascular ($p = 0,06$).

Curiosamente, se observaron algunas tendencias entre sobreexpresión de las isoformas de *p73* y los receptores de hormonas: altos niveles de las variantes $\Delta Ex2p73$ y $\Delta Ex2/3p73$ se asociaron con receptores de estrógenos negativos ($p = 0,06$ y $p = 0,07$, respectivamente) y sobreexpresión de la isoforma $TAp73$ se asoció con receptores de progesterona negativos ($p = 0,06$).

Tabla 7. Asociaciones entre los niveles de expresión de las isoformas de *p73* (columnas) y las características moleculares y patológicas de la serie de cáncer de mama (filas). Media geom., media geométrica de los niveles de expresión. La *p* se calculó por el análisis de varianza (ANOVA).

Características de la serie de mama	Total (%)	Media geom $\Delta Ex2p73$	<i>p</i>	Media geom. $\Delta Ex2/3p73$	<i>p</i>	Media geom. $\Delta Np73$	<i>p</i>	Media geom. $TAp73$	<i>p</i>
Pacientes	60	60		60		60		60	
Edad media	65.5±17.8								
Tipo histológico									
Ductal	45 (75%)	0.6		0.9		0.8		1.16	
Lobulillar	7 (11.7%)	1.36	0.3	1.4	0.12	1.22	0.14	3.4	0.09
Otro	8 (13.3%)	0.3		0.15		0.15		0.06	
Grado histológico									
1	10 (16.6%)	0.5		0.36		1.1		1.16	
2	15 (25%)	0.5	1	1.15	0.58	0.6	0.8	0.21	0.38
3	35 (58.4%)	0.5		0.73		0.7		1.4	
Estadio tumoral									
I	5 (8.3%)	0.4		0.9		0.46		0.07	
II	40 (66.7%)	0.8	0.7	1.14	0.6	1.1	0.8	0.6	0.7
III	15 (25%)	0.5		0.5		1		0.33	
Tamaño tumoral									
< 2 cm	25 (41.6%)	0.5	0.6	0.64	0.7	0.5	0.5	0.4	0.2
≥ 2 cm	35 (58.4%)	0.64		0.8		0.8		1.6	
Invasión vascular									
No	35 (58.3%)	0.3	0.05	0.7	0.7	0.37	0.06	0.8	0.8
Si	25 (41.7%)	0.9		0.8		1.02		1.05	
Afectación ganglionar									
< 3 nódulos	49 (81.7%)	0.6	0.7	0.8	0.6	0.74	0.5	0.85	0.45
≥ 3 nódulos	11 (18.3%)	0.8		0.5		1.15		2.43	
Receptores de estrógenos									
Negativo	12 (20%)	1.55	0.06	1.7	0.07	1.85	0.3	1.4	0.2
Positivo	48 (80%)	0.42		0.6		0.7		0.22	
Receptor de progesterona									
Negativo	22 (36.7%)	0.7	0.7	1.06	0.7	0.8	0.8	1.73	0.06
Positivo	38 (63.3%)	0.56		0.78		0.9		0.13	
Índice proliferativo									
Negativo	27 (45%)	0.4	0.95	0.3	0.6	0.7	0.7	0.04	0.2
Positivo	33 (55%)	0.37		0.57		0.5		0.3	
erb-B2									
Negativo	30 (50%)	0.6	0.6	0.7	0.3	1.1	0.5	0.34	0.97
Positivo	30 (50%)	0.7		1.2		0.7		0.35	
p53									
Negativo	37 (62%)	0.8	0.28	1.06	0.45	1.4	0.04	0.4	0.7
Positivo	23 (38%)	0.41		0.6		0.3		0.24	

2. IMPLICACIÓN DE LAS ISOFORMAS DE *p73* EN EL PROCESO ANGIOGÉNICO EN CÁNCER DE COLON

2.1 Correlación entre los niveles de expresión de VEGF, VEGF_{165b}, PEDF y las isoformas de p73

Los niveles de expresión del ARNm de *VEGFtotal*, *VEGF*, *VEGF_{165b}*, *PEDF* y las distintas isoformas de *p73* fueron examinadas en 112 tejidos tumorales y sus correspondientes normales. El estudio de la expresión de *VEGF_{165b}* se llevó a cabo en 65 de los casos. La media, los valores mínimo y máximo y los percentiles 25 y 75 para la expresión de *VEGFtotal*, *VEGF*, *VEGF_{165b}* y *PEDF* se muestran en la tabla 8. Los niveles de la expresión cuantitativa de cada caso para cada gen se ilustran mediante los histogramas en la figura 7.

A través de un estudio correlativo en las muestras de los pacientes, tratamos de evaluar si las distintas isoformas de *p73* podrían estar involucradas en el proceso angiogénico. Así, se encontraron correlaciones directas estadísticamente significativas entre los niveles de *VEGF* y las formas *TAp73* y *ΔNp73* (Tabla 9, Figuras 8c y 8d). También se observó una tendencia para la isoforma *ΔEx2p73* (Tabla 9, Figura 8a). De manera similar, se observaron correlaciones positivas estadísticamente significativas entre los niveles de expresión de *VEGF_{165b}* y *ΔEx2p73*, *ΔEx2/3p73*, *ΔNp73* y *TAp73* (Tabla 9, Figura 8e-8h).

Tabla 8. Media, mínimo y máximo, y percentiles 25 y 75, de los niveles de expresión *VEGF*, *VEGF_{165b}*, y *PEDF* para las muestras de cáncer de colon expresadas en logaritmo de base 10 (log10).

	<i>VEGFtotal</i>	<i>VEGF</i>	<i>VEGF_{165b}</i>	<i>PEDF</i>
Media	0.06	0.07	0.23	-0.06
Máximo	1.71	1.49	1.04	1.86
Mínimo	-2.12	-1.64	-0.9	-1.7
Percentiles				
25	-0.36	-0.33	-0.1	-0.4
75	0.47	0.41	0.45	0.32

NOTA: *VEGFtotal*, contiene todas las isoformas de *VEGF*; *VEGF*, contiene aquellas formas que presentan el exón 8 y muestran propiedades angiogénicas; *VEGF_{165b}*, contiene específicamente la variante *VEGF_{165b}*.

Tabla 9. Correlaciones entre los niveles de expresión de las distintas isoformas de *p73* y *VEGF*, *VEGF_{165b}*, *PEDF* y *E2F-1* para los casos de carcinoma de colon

	$\Delta Ex2p73$	$\Delta Ex2/3p73$	$\Delta Np73$	$TAp73$	<i>E2F-1</i>
<i>VEGF</i>	$p = 0.07$ ($r = 0.2$)	Ns	$p = 0.05$ ($r = 0.2$)	$p = 0.002$ ($r = 0.3$)	$p = 0.03$ ($r^\dagger = 0.2$)
<i>VEGF_{165b}</i>	$p = 0.037$ ($r = 0.3$)	$p = 0.035$ ($r = 0.3$)	$p = 0.037$ ($r = 0.3$)	$p = 0.005$ ($r = 0.4$)	ns
<i>PEDF</i>	$p = 0.04$ ($r = -0.33$)*	-	-	-	ns

VEGF, amplifica aquellas formas que contienen el exón 8 y muestran propiedades angiogénicas; *VEGF_{165b}*, amplifica específicamente la variante *VEGF_{165b}*. La *p* se calculó por el análisis de varianza (ANOVA). La *r* y *r*[†] son los coeficientes de Pearson y Spearman, respectivamente. ns, no correlación estadística significativa; —, no analizadas

No se observaron correlaciones significativas entre los niveles expresión de *PEDF* y las diferentes variantes de *p73*. Pero cuando los casos fueron divididos en terciles según los niveles de expresión de $\Delta Ex2p73$ ($\Delta Ex2p73$ -1, valores inferiores a 0,51, $\Delta Ex2p73$ -2, valores de 0,51 a 1,34, y $\Delta Ex2p73$ -3, valores superiores a 1,34), se observó una correlación inversa entre $\Delta Ex2p73$ y *PEDF* en el grupo $\Delta Ex2p73$ -1 ($p = 0.04$, $r = -0.33$).

Figura 7. Cuantificación de los niveles de expresión (tumoral/normal) de *VEGFtotal*, *VEGF*, *VEGF_{165b}*, *PEDF*, $\Delta Ex2p73$, $\Delta Ex2/3p73$, $\Delta Np73$, *TAp73* y *E2F-1* en los distintos individuos de nuestra serie de cáncer distribuidos en relación a la media.

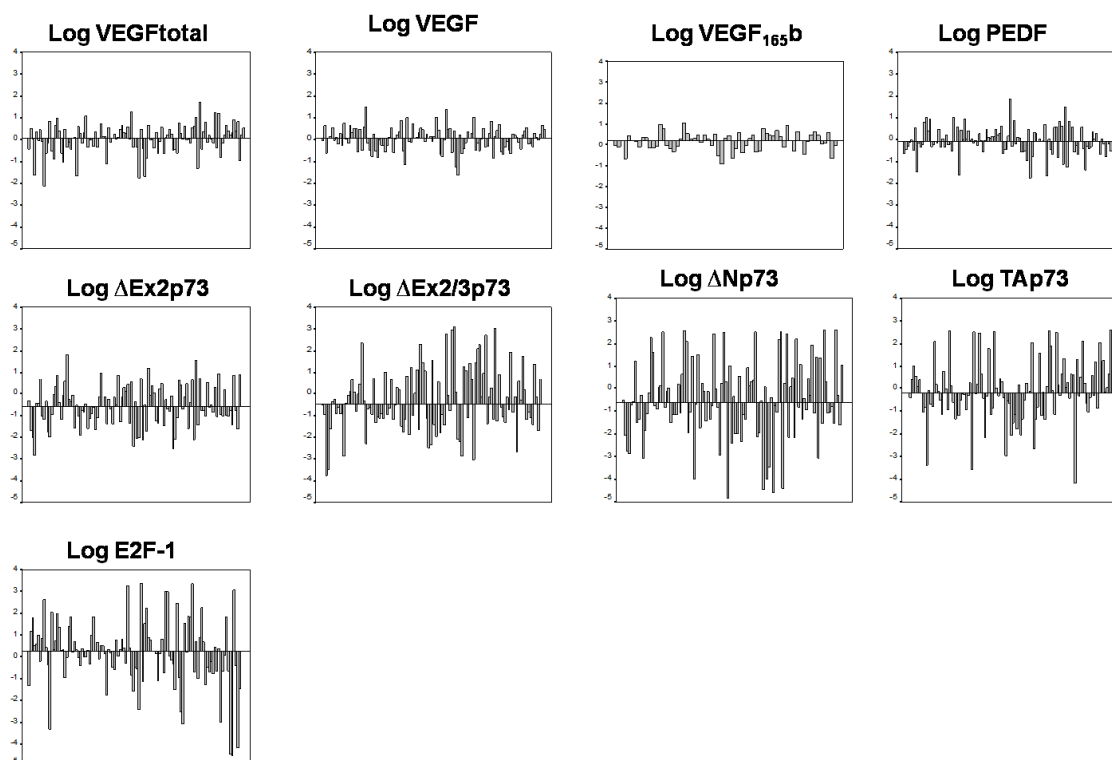
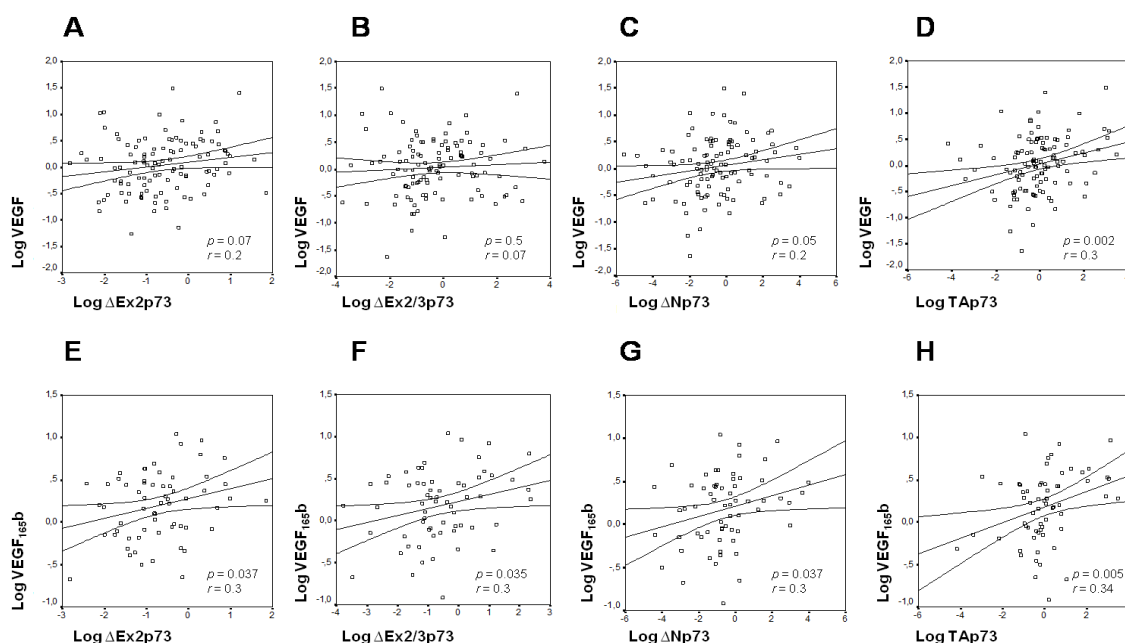


Figura 8. Correlaciones entre *VEGF* y las isoformas de *p73* (a-d) y entre *VEGF*_{165b} y las isoformas de *p73* (e-h) en la serie de cáncer de colon. La *p* se calculó por el análisis de varianza (ANOVA); la *r* es el coeficiente de Pearson. Nota: *VEGF*_{165b} se analizó en 65 parejas de tejido normal-tumoral; el resto de genes se analizaron en las 112 parejas.



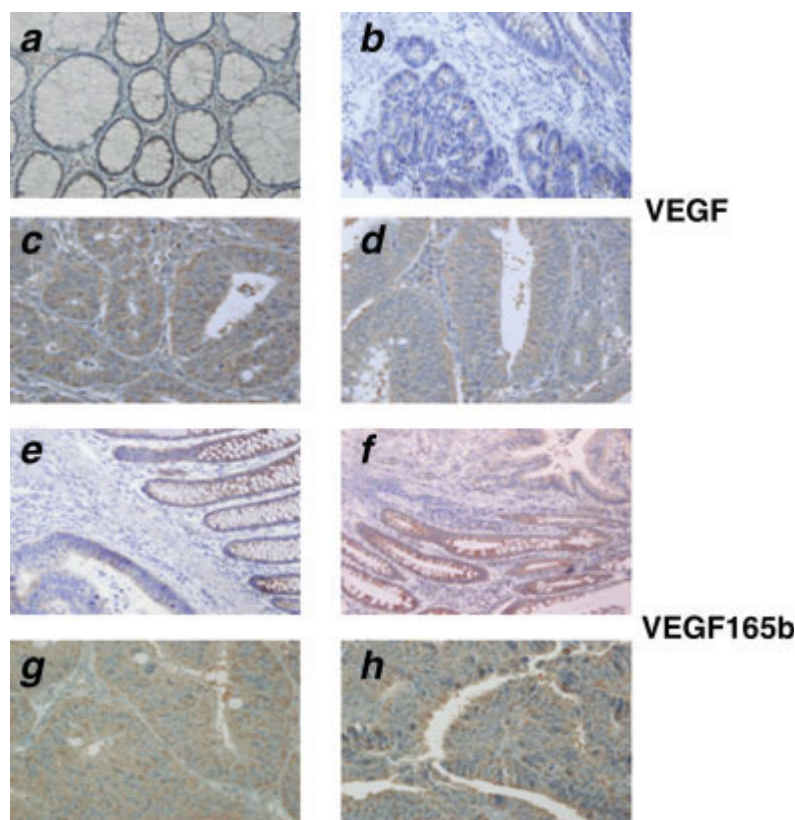
2.2 La expresión proteica de VEGF y VEGF_{165b}. Correlación con los niveles de ARNm

Se analizaron por inmunohistoquímica 20 casos de cáncer de colon para la expresión de la proteína VEGF y 10 casos de cáncer de colon para la expresión de VEGF_{165b}. Todos los tumores mostraban inmunotinción citoplasmática positiva para VEGF (desde intensidad débil-moderada a fuerte) (Figuras 9b y 9d). La pareja de tejido normal mostraba también inmunotinción positiva, en teoría podría ser debido a la presencia en la mucosa normal de VEGF_{165b} (Figuras 9a y 9b). Observamos unas tendencias directas entre la expresión de proteína VEGF y los niveles de ARNm de *VEGF*_{total} y *VEGF* ($p = 0,1$ y $p = 0,18$, respectivamente). La media geométrica de los niveles de ARNm de *VEGF*_{total} en pacientes con tinción débil-moderada (35%) y tinción fuerte (65%) para la proteína VEGF fue 0,4 y 1.6, respectivamente y 0,7 y 2.1, respectivamente, para el nivel de ARNm de *VEGF*. Del mismo modo, se observaron tendencias entre la inmunotinción de VEGF y los niveles de ARNm de *ΔEx2p73*, *ΔEx2/3p73* y *TAp73* ($p=0,19$, $p=0,09$ y $p=0,1$, respectivamente). La media geométrica de los niveles de ARNm de *ΔEx2p73*, *ΔEx2/3p73* y *TAp73* fue 0,15, 0,04 y 0,54,

respectivamente, para pacientes con tinción de VEGF débil-moderada y 0,6, 0,7 y 1,6, respectivamente para pacientes con una fuerte inmunotinción para la proteína VEGF.

La expresión de la proteína VEGF_{165b} se correlaciona con la cuantificación del ARNm en 7 de los 10 casos de colon. La expresión proteica de VEGF_{165b} se localiza en el citoplasma tanto del tejido normal como del tumoral (Figuras 9e y 9f). No se detectó inmunotinción significativa de VEGF_{165b} en el estroma (Figuras 9e y 9h).

Figura 9. Inmunohistoquímica de VEGF (a–d) y VEGF_{165b} (e–h) en carcinomas de colon humanos. La expresión de VEGF se muestra en células normales (a), en tumor y su tejido adyacente normal (b), tumores con fuerte tinción (c), y débil-moderada (d). Para VEGF_{165b} se representa una inmunotinción más fuerte de el tejido normal respecto al adyacente normal (e, f), y tinción citoplasmática en células tumorales (g, h).

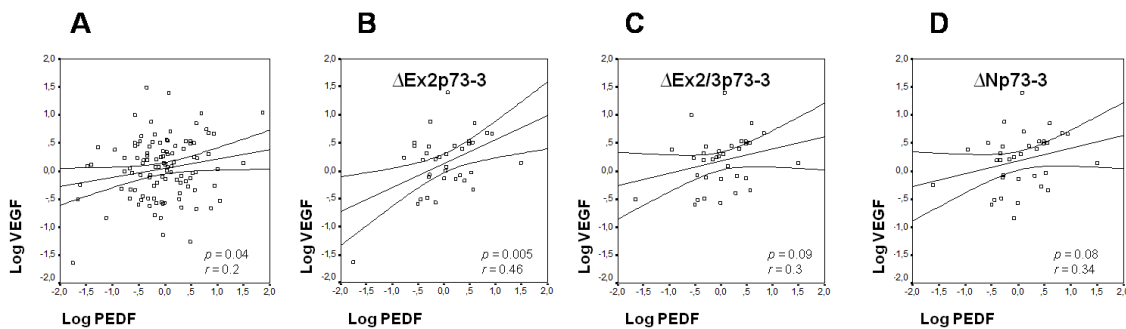


2.3 Correlación entre los niveles de expresión de VEGF y PEDF

A través de un estudio correlativo en las muestras de los pacientes con cáncer de colon tratamos de evaluar si VEGF podría afectar a la expresión de PEDF o viceversa. Una correlación directa estadísticamente significativa se observó entre los niveles de ARNm de *VEGF* y *PEDF* ($p = 0,04$, $r = 0,2$) (Figura 10A). Obviamente, esta asociación no se encontró cuando los niveles de expresión de *VEGF* fueron analizados con el conjunto de cebadores que amplifican tanto las variantes *VEGF*_{xxx} como las *VEGF*_{xxx}*b* (conjunto de cebadores *VEGF*_{total}). La mayoría de los estudios previos a este realizado en nuestro grupo evaluaban los niveles de expresión de *VEGF* utilizando conjuntos de cebadores que amplifican ambas formas, lo que probablemente conlleva a resultados confusos.

Seguidamente, se analizó el efecto que los niveles de expresión de las distintas isoformas de *p73* podían ejercer en la correlación observada entre *VEGF* y *PEDF*. Los casos fueron divididos en terciles en función de la expresión de las distintas isoformas de *p73*: $\Delta Ex2p73-1$ (valores inferiores a 0,09), $\Delta Ex2p73-2$ (de 0,09 a 0,66) y $\Delta Ex2p73-3$ (superiores a 0,66); $\Delta Ex2/3p73-1$ (valores inferiores a 0,085), $\Delta Ex2/3p73-2$ (de 0,085 a 1,24) y $\Delta Ex2/3p73-3$ (superiores a 1,24); $\Delta Np73-1$ (valores inferiores a 0,07), $\Delta Np73-2$ (de 0,07 a 1,3) y $\Delta Np73-3$ (superiores a 1,3); $TAp73-1$ (valores inferiores a 0,28), $TAp73-2$ (de 0,28 a 1,7) y $TAp73-3$ (superiores a 1,7). Una correlación directa entre la expresión de *VEGF* y *PEDF* fue observada en el grupo $\Delta Ex2p73-3$ ($p = 0,005$, $r = 0,463$) (Figura 10B). También se observaron tendencias positivas en el grupo $\Delta Ex2/3p73-3$ ($p = 0,09$, $r = 0,3$) y $\Delta Np73-3$ ($p = 0,08$, $r = 0,343$) (Figura 10C-D).

Figura 10. Correlación entre *VEGF* y *PEDF* (a), y esta misma correlación cuando la población se dividió en terciles en función de los niveles de expresión de las isoformas de *p73* (b-d). Correlación entre *VEGF* y *PEDF* en el grupo de pacientes con mayores niveles de expresión de $\Delta Ex2p73$ ($\Delta Ex2p73-3$) (b), grupo de pacientes con mayores niveles de expresión de $\Delta Ex2/3p73$ ($\Delta Ex2/3p73-3$), y (c) grupo de pacientes con mayores niveles de $\Delta Np73$ ($\Delta Np73-3$) (d).

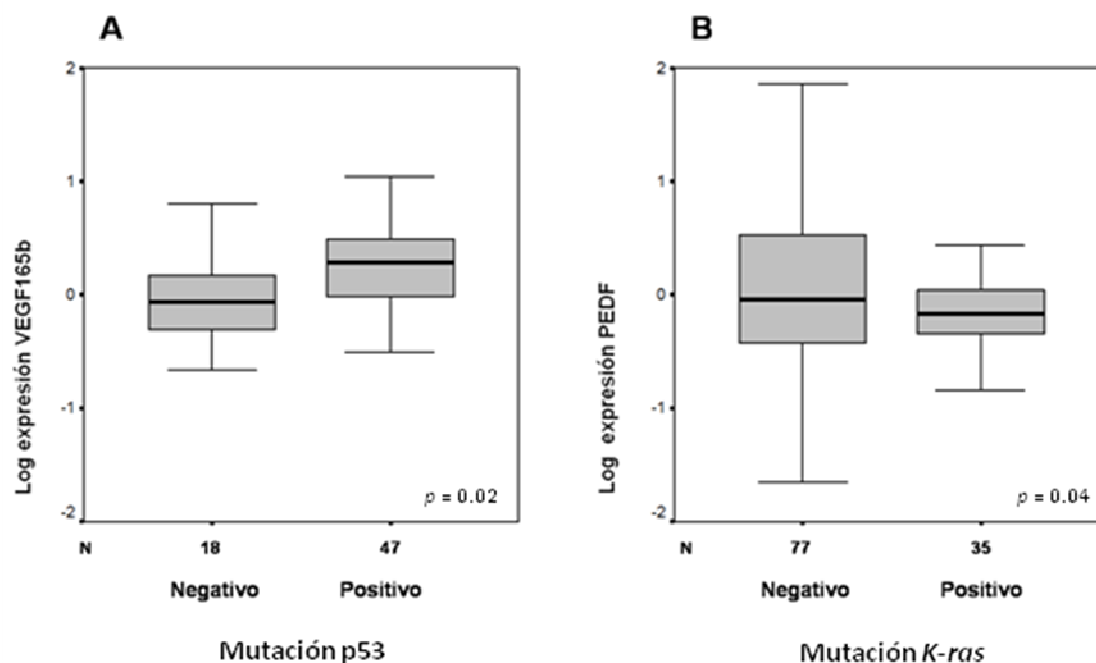


2.4. Asociación entre eventos moleculares implicados en transformación celular y los niveles de expresión de VEGF, VEGF_{165b} y PEDF

Se ha sugerido que ciertos eventos específicos, como por ejemplo las mutaciones inactivantes en el gen supresor tumoral *p53* y aquellas que cursan con la activación oncogénica de *K-ras*, podrían afectar los niveles de expresión de VEGF y PEDF. En nuestra serie, observamos una asociación entre la tinción positiva de *p53* y altos niveles de VEGF_{165b} ($p = 0,02$) (Figura 11A). La media geométrica de los niveles de VEGF_{165b} fue 0,95 cuando la tinción de *p53* fue negativa y 1,8 cuando fue positiva. No se observó una asociación similar para VEGF o PEDF.

Además, se encontró una asociación estadística entre mutaciones de *K-ras* y niveles bajos de ARNm de PEDF ($p = 0,04$) (Figura 11B). La media geométrica de los niveles de PEDF fue de 0,6 cuando *K-ras* estaba mutado y 1.1 cuando no se encontraba alterado. No se encontraron otras asociaciones adicionales con VEGF y/o VEGFtotal.

Figura 11. Asociación entre los niveles de expresión de VEGF_{165b} y mutación en *p53* (A), y entre los niveles de expresión de PEDF y mutación en *K-ras* (B). N, número de pacientes. La altura de las cajas es igual al recorrido intercuartílico.



2.5 Asociación entre los niveles de ARNm de VEGF y los parámetros patológicos de los carcinomas de colon

El análisis de la relación entre los niveles de expresión de *VEGF* y los parámetros patológicos de los tumores reveló algunas asociaciones significativas en la serie de pacientes con cáncer de colon. Observamos una asociación entre la sobreexpresión de *VEGF* y la presencia de pólipos en la pieza quirúrgica ($p = 0.013$). La media geométrica de los niveles de *VEGF* en pacientes con ausencia de pólipos (71,4%) y la presencia de pólipos (28,6%) fue 0,9 y 1,7, respectivamente.

Los niveles de expresión de *VEGF* se asociaron con estadios avanzados ($p = 0,01$). La media geométrica de su expresión fue 0,6 en el estadio I y 1,31 en el estadio IV.

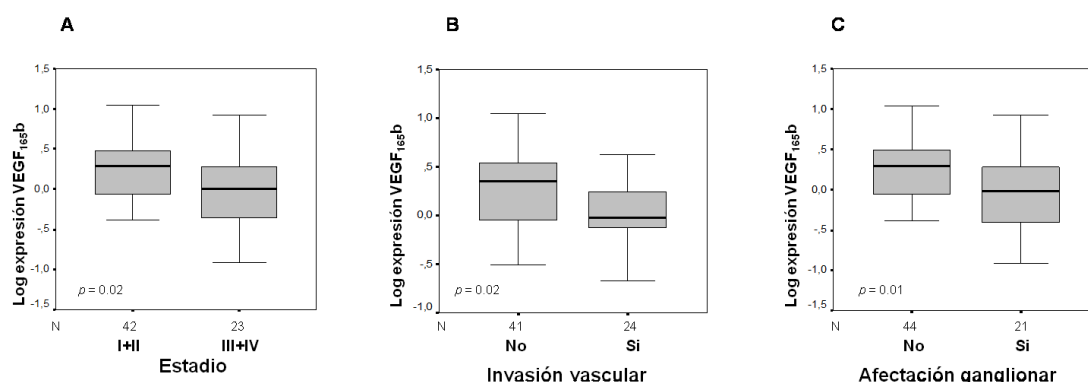
2.6 Asociación entre los niveles de expresión de $VEGF_{165b}$ y las características patológicas de los carcinomas de colon

Este es el primer estudio que analiza la implicación de *VEGF_{165b}* en carcinoma de colon. El análisis de la relación entre los niveles de expresión de *VEGF_{165b}* y los datos patológicos de los tumores reveló asociaciones muy interesantes. Encontramos una asociación entre los niveles de expresión de *VEGF_{165b}* y el estadio tumoral cuando los casos fueron clasificados en dos grupos, el grupo de los estadios tumorales I y II (I + II) y el de los estadios III y IV (III + IV). La expresión de *VEGF_{165b}* fue significativamente inferior en aquellos casos del grupo de estadios III + IV ($p = 0,02$), con medias geométricas de 1 para los estadios III + IV y 1,8 para los estadios I + II (Figura 12A).

Niveles bajos de ARNm de *VEGF_{165b}* se asociaron significativamente con invasión vascular ($p = 0,02$). La media geométrica de los niveles de *VEGF_{165b}* de los 41 de 65 pacientes (63%) que no mostraban invasión vascular fue 1,7; el 37% restante, con invasión vascular, presentaba una media geométrica de los niveles de expresión de 1 (Figura 12B).

Finalmente, la presencia de afectación ganglionar se asoció con baja expresión de *VEGF_{165b}* ($p = 0,01$). La media geométrica de su expresión en los 21 de 65 pacientes (32%) con afectación ganglionar fue 0,9; y en aquellos sin afectación (44 de 65, 68%), fue de 1,8 (Figura 12C).

Figura 12. Asociación entre los niveles de expresión de $VEGF_{165b}$ y estadio tumoral (A), invasión vascular (B) y afectación ganglionar (C). N, número de pacientes. La altura de las cajas es igual al recorrido intercuartílico.



2.7 Asociación entre los niveles de expresión de $PEDF$ y las características patológicas de los tumores

Este es el primer trabajo que evalúa el papel de $PEDF$ en tumores primarios humanos. Curiosamente, de manera similar a lo descrito anteriormente para las variantes de $p73$, se observó una asociación significativa entre la ubicación del tumor y los niveles de expresión de $PEDF$ ($p = 0,05$). La media geométrica para los niveles de $PEDF$ fue 1,5, 0,71 y 0,68 para recto, colon derecho e izquierdo, respectivamente.

Además, se observó una tendencia entre los niveles de expresión de $PEDF$ y la edad al diagnóstico de la enfermedad. Concretamente, se encontraron niveles más bajos de este factor antiangiogénico en aquellos pacientes con una edad al diagnóstico inferior a 50 años ($p = 0,06$).

Finalmente, los casos fueron divididos en dos grupos en función de la expresión de $PEDF$, con la mediana como punto de corte: $PEDF-1$ (valores inferiores o iguales a 0,87) y $PEDF-2$ (valores superiores a 0,87), se encontró una asociación entre niveles bajos de expresión de $PEDF$ y la invasión vascular en el grupo de $PEDF-1$ ($p = 0.028$). La media geométrica de la expresión de $PEDF$ de los 22 (39%) pacientes de este grupo con invasión vascular fue 0,1; el restante 61% que no mostraban invasión vascular presentaba una media geométrica de la expresión de 0,4.

2.8 Inducción de E2F-1 por VEGF

La media, los valores mínimo y máximo y los percentiles 25 y 75 para la expresión de *E2F-1* se muestran en la tabla 7. Un histograma que ilustra los niveles de expresión de *E2F-1* para cada individuo se muestra en la Figura 5. VEGF afecta a la proliferación neuronal a través de la regulación de la familia de factores de transcripción *E2F* (Zhu, Jin et al. 2003). En nuestra serie se observó una correlación directa entre los niveles de expresión de *VEGF* y *E2F-1* ($p = 0,03$, $r = 0,2$) (Tabla 9). No se encontraron asociaciones similares con *VEGF_{165b}* o *VEGF_{total}*.

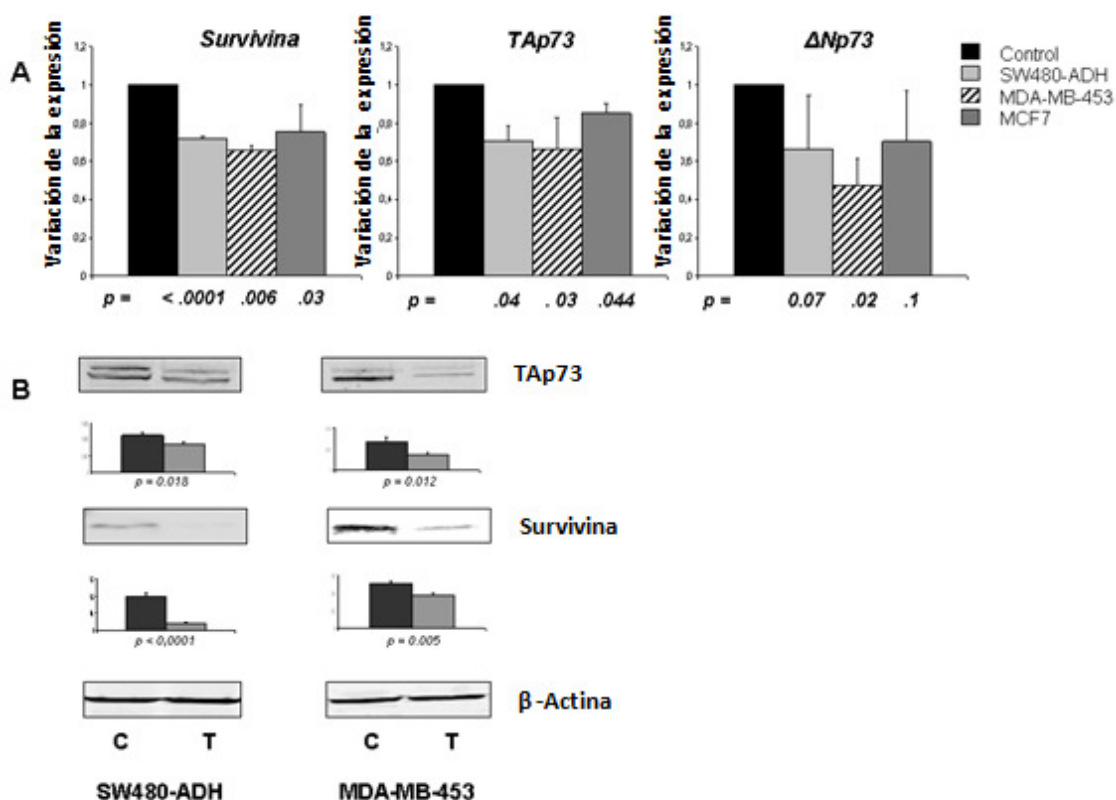
3. MECANISMOS REGULADORES DE LA EXPRESIÓN DE *p73*

3.1 La forma activa de la vitamina D, 1,25(OH)₂D₃, disminuye la expresión de survivina y de las isoformas de p73 en células tumorales de colon y mama

Se usaron las siguientes líneas celulares para estudiar el efecto de 1,25(OH)₂D₃ sobre la expresión de survivina y las isoformas de *p73*, la línea de cáncer de colon SW480-ADH, y las líneas de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-453. Se observó una disminución significativamente estadística de los niveles de ARNm de survivina y la isoforma TAp73 en las tres líneas celulares después de 48 horas de tratamiento con 1,25(OH)₂D₃ (Figura 13A). Una reducción en la transcripción de $\Delta Np73$ también fue detectada, pero fue estadísticamente significativa sólo para la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-453 (Figura 13A). No se observaron cambios en la expresión de survivina y de las variantes de *p73* después de 3 y 6 horas de tratamiento ni a nivel de mensajero ni de proteína.

Los niveles de proteína para survivina, TAp73 y $\Delta Np73$ después de tratamiento con 1,25(OH)₂D₃ durante 48 horas fueron evaluados en las líneas celulares de cáncer de colon SW480-ADH y cáncer de mama MDA-MB-453. Se observó una disminución significativa en los niveles de survivina (75% y 30% respectivamente) y de la isoforma TAp73 (20% y 47%, respectivamente) (Figura 13B). Desafortunadamente, la proteína $\Delta Np73$ no pudo ser detectada con el panel de anticuerpos que utilizamos.

Figura 13. (A) Reducción de la expresión de survivina, *TAp73* y $\Delta Np73$ a nivel de ARNm después del tratamiento con $1,25(OH)_2D_3$ en las líneas celulares SW480-ADH, MDA-MB-453 y MCF-7. El eje “y” representa el cambio a nivel transcripcional de las células tratadas con $1,25(OH)_2D_3$ comparadas con las células tratadas con el vehículo-control. El cambio fue calculado dividiendo la expresión de ARNm en las células tratadas por la de las células no tratadas. Representación de tres experimentos independientes (media \pm desviación estándar) Al valor de expresión de las células no tratadas se les dió el valor 1. (B) $1,25(OH)_2D_3$ reduce la expresión de las proteínas survivina y TAp73 en líneas celulares de cáncer de colon (SW480-ADH) y mama (MDA-MB-453). Los niveles de proteína fueron evaluados por western blot. β -actina fue usada como control de carga. Se muestra un western blot representativo. Los gráficos representan la media, desviación estándar y el valor de *p* de tres experimentos independientes.

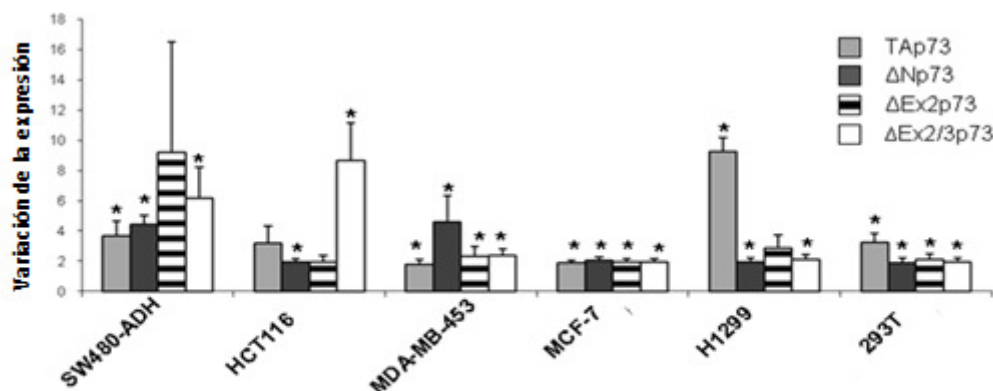


3.2 Survivina induce la expresión de las isoformas de *p73* en células tumorales humanas

Las siguientes líneas celulares fueron transfectadas de manera transitoria con un vector de expresión vacío, como control negativo, o con un vector de expresión que contenía *survivina*, SW480-ADH, HCT116, MDA-MB-453, MCF-7, H1299 y 293T. La expresión ectópica de survivina llevó a un aumento de ARNm de las isoformas *TAp73*, $\Delta Np73$, $\Delta Ex2p73$ y $\Delta Ex2/3p73$, de entre 1.6-17 veces en comparación con las mismas células transfectadas con el vector vacío (Figura14). Las células SW480-ADH y MDA-MB-453 mostraban los niveles más altos de las variantes de *p73* a 48 horas después de la transfección; HCT116, MCF-7 y 293T a 24 h; y H1299 a 18 h. Estos puntos también coinciden con los niveles más altos de expresión de *survivina* después de los

experimentos de transfección, los cuales varían entre un rango de 70 (para SW480-ADH) y de 14 (para MCF7 y 293T).

Figura 14. Aumento de expresión del ARNm de las distintas isoformas de *p73* en las líneas celulares SW480-ADH, HCT116, MDA-MB-453, MCF-7, H1299 y 293T después de la transfección con *survivina*. El eje “y” representa el incremento de los transcritos en las células transfectadas con *survivina* comparadas con las transfectadas con el vector vacío. Este cambio fue calculado por la división de la expresión del ARNm de las células transfectadas con *survivina* entre las células transfectadas con el vector vacío. Representación de tres experimentos independientes (media \pm desviación estándar). * $p < 0.05$.

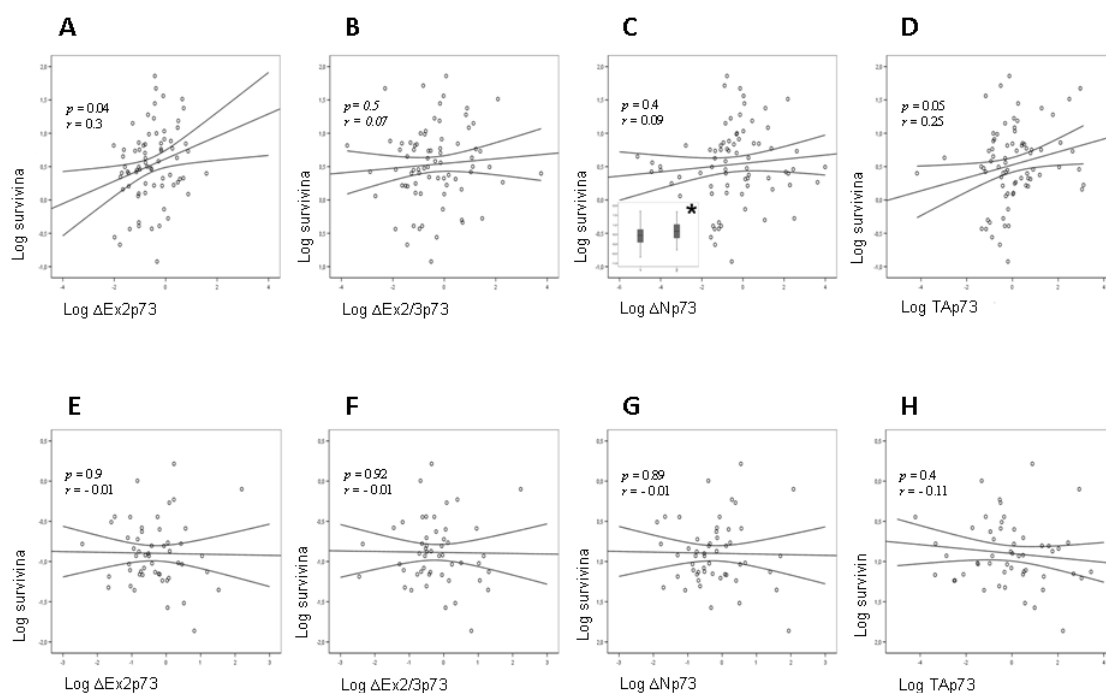


3.3 Correlación entre los niveles de las variantes de *p73*, *survivina* y *VDR* en pacientes de cáncer de colon y mama

En la serie de cáncer de colon, se encontró una correlación estadística directa entre la expresión de *survivina* y los niveles de las isoformas $\Delta Ex2p73$ y $TAp73$ ($p = 0,04$, $r = 0,3$ y $p = 0,05$, $r = 0,25$, respectivamente) (Figura 15 A-D). Cuando los datos de expresión de la variante $\Delta Np73$ fueron divididos en dos grupos en función de la media, aquellos pacientes con expresión de $\Delta Np73$ por encima de la media mostraron los niveles más altos de *survivina*. Los niveles de expresión media de *survivina* en los pacientes con niveles de $\Delta Np73$ por encima y por debajo de la media fue de 4,7 y 3, respectivamente ($p = 0.017$) (Figura 15C). Por el contrario, no se encontró esta correlación entre la expresión de las isoformas de *p73* y *survivina* en las muestras de mama (Figura 15 E-H).

Además, los niveles de expresión de $\Delta Ex2p73$ y $\Delta Np73$ se asociaron de forma inversa con la expresión de *VDR* en las muestras de pacientes con cáncer de colon. Esta correlación fue estadísticamente significativa ($p = 0,01$, $r = -0,3$ y $p = 0,02$, $r = -0,3$, respectivamente). No se observaron asociaciones en la serie de cáncer de mama.

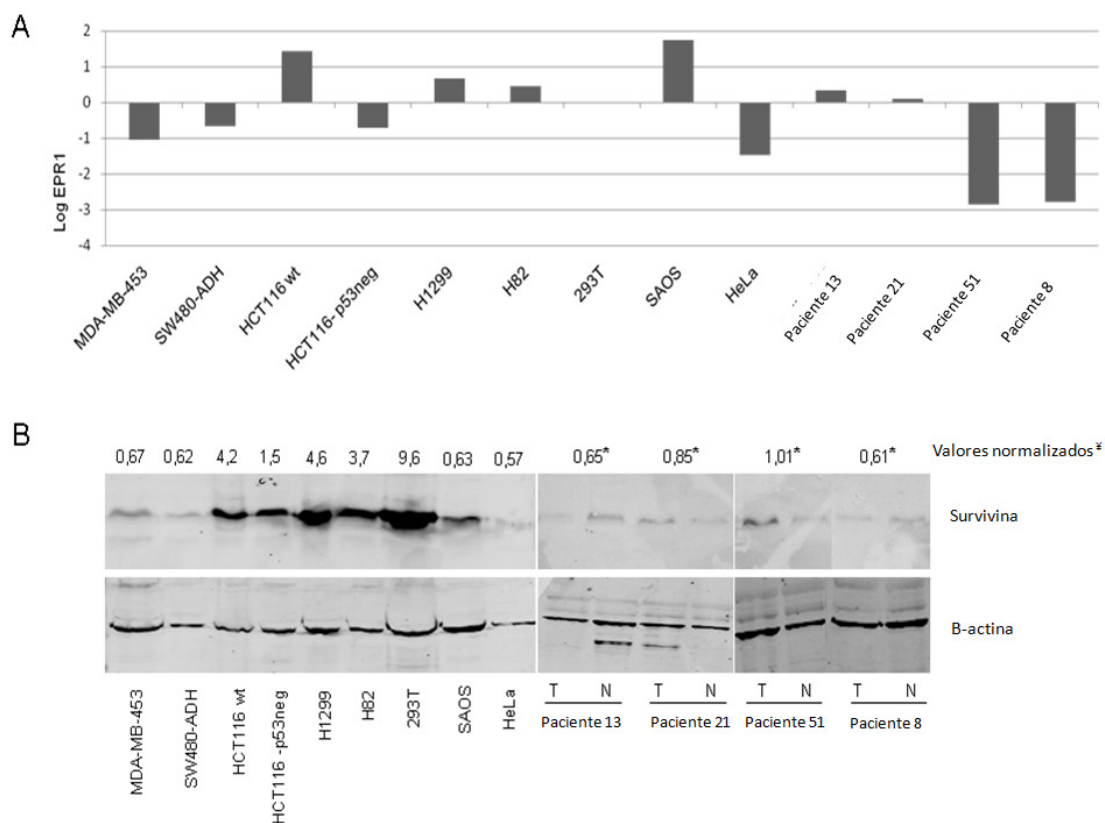
Figura 15. Correlaciones entre los niveles de expresión de las isoformas de *p73* y *survivina* en tumores de pacientes con cáncer de colon (A, B, C, D) y mama (E, F, G, H). La *p* se calculó por el análisis de varianza (ANOVA); *r* es el coeficiente de Pearson. *Asociación observada cuando se dividen los casos en función de la media de los niveles de expresión de $\Delta Np73$ ($p = 0.017$).



3.4 Correlación entre los niveles de survivina y de *EPR1*

Se observó una correlación positiva estadísticamente significativa entre los niveles de ARNm de *EPR1* y *survivina* en las series de cáncer de colon y de mama ($p < 0,0001$, $r = 0,6$ y $p = 0,001$, $r = 0,6$, respectivamente). Además, los niveles de proteína de survivina fueron evaluados en 4 muestras normal y tumoral de nuestra colección de cáncer de colon y en 9 líneas de celulares derivadas de tumores (MDA-MB-453, SW480-ADH, tipo de HCT116-p53 nativo, HCT116-p53 negativo, H1299, H82, 293T, SAOs-2 y HeLa) y se compararon con los niveles de expresión del ARNm de *EPR1*. Los niveles de proteína y ARNm fueron clasificados como superiores o inferiores a la mediana (Figura 16 A). En 6 casos observamos que los niveles de expresión eran opuestos, es decir, cuando uno de los productos mostraba alta expresión, el otro los mostraba bajos. En los restantes 7 casos, la proteína de survivina y el transcrito de *EPR1* fueron ambos bajos o altos (Figura 16 A, B).

Figura 16. La mediana de los niveles de ARNm de *EPR-1* (A) y de la expresión proteica de survivina (B) en tejido normal y tumoral de 4 pacientes con cáncer de colon y en 9 líneas celulares (representación de tres experimentos independientes). Los niveles de proteína y ARNm fueron clasificados como altos o bajos según la mediana (2.85 para los niveles de *EPR-1* y 0.85 para la expresión de survivina). β -actina se uso como control de carga para todas las muestras. *Los datos de los pacientes se describen como ratio T/N. wt, nativo; neg, negativo.



3.5 Correlación entre los niveles de expresión de survivina y EPR1 con los parámetros clínico-patológicos de los tumores

En nuestra serie de colon, los niveles de *survivina* fueron mayores en el estadio II que en los estadios I, III y IV ($p = 0,04$), con una media geométrica de expresión de *survivina* de 0,2 en estadio II, 0,06 en los estadios I y IV, y 0,08 en estadio III (Tabla 10A). En los pacientes con cáncer de mama, una expresión elevada de *survivina* se asoció con receptores de progesterona negativos ($p = 0,008$) y c-erb2 positivo ($p = 0,038$) (Tabla 10 B). Los niveles medios de *survivina* fueron 0,26 y 0.098 en aquellos casos que muestran receptores de progesterona positivos y negativos; y 8 y 3.2 en los casos con expresión positiva y negativa para c-erb2, respectivamente.

Observamos algunas asociaciones interesantes entre la expresión de *EPR-1* y la edad al diagnóstico y el estadio del tumor en la serie de cáncer de colon. Los casos con edad al diagnóstico menor o igual a 50 años presentaban niveles menores de la expresión de *EPR-1* que aquellos pacientes diagnosticados a una edad mayor de 50, con

expresiones promedio de 0,6 y 3,2 para pacientes por debajo y por encima de los 50 años respectivamente ($p = 0,01$) (Tabla 10A). Del mismo modo, los pacientes con estadio I muestran niveles más altos de *EPR-1* que aquellos en estadios más avanzados ($p = 0,05$), con expresiones promedio de 5.5 para estadio I y 2,16, 2,37 y 2,66 para estadios II, III y IV, respectivamente.

En las pacientes de cáncer de mama, se observó una asociación entre los niveles de *EPR-1* y el estado de los receptores de estrógenos y progesterona ($p = 0.025$ y $p = 0,005$, respectivamente) (Tabla 10B). Las pacientes con receptores negativos de estrógenos y de progesterona presentaban niveles más altos de *EPR-1* (media geométrica de 8.5 y 6.3, respectivamente) que aquellas con receptores positivos (media geométrica de 1.6 y 1,15, respectivamente).

Tabla 10. Asociación entre los niveles de expresión de *survivina* y *EPRI* y las características patológicas y moleculares de las series de pacientes de colon (A) y mama (B).
Media geom.; media geométrica. La *p* se calculó por el análisis de varianza (ANOVA).

A

Características de la serie de colon	Total (%)	Media geom. Survivina	<i>p</i>	Media geom. EPRI	<i>p</i>
Pacientes	75	75		75	
Edad media	69.2±11.8				
Edad al diagnóstico			0.5		.01
≤ 50	6 (8%)	0.11		0.6	
> 50	69 (92%)	0.18		3.2	
Sexo			0.2		0.2
Hombre	40 (53%)	0.14		3.4	
Mujer	35 (47%)	0.22		2.1	
Localización			0.5		0.5
Izquierda	32 (42.7%)	0.14		3.1	
Derecha	22 (29.3%)	0.11		2.1	
Recto	21 (28%)	0.092		2.9	
Estadio tumoral			.04		.05
I	8 (10.7%)	0.06		5.5	
II	43 (57.3%)	0.2		2.16	
III	19 (25.3%)	0.08		2.36	
IV	5 (6.7%)	0.06		2.66	
Invasión vascular			0.5		0.7
No	50 (66.7%)	0.13		2.8	
Si	25 (33.3%)	0.10		2.5	
Pólipos			0.4		0.7
No	53 (70.7%)	0.13		2.6	
Si	22 (29.3%)	0.095		3	
Afectación ganglionar			0.06		0.7
Negativa	53 (70.7%)	0.14		2.8	
Positiva	22 (29.3%)	0.08		2.4	
Diferenciación tumoral			0.5		0.9
Buena	46 (61.3%)	0.11		2.5	
Moderada	24 (32%)	0.14		3	
Pobre	5 (6.7%)	0.70		2.6	

B

Características de la serie de mama	Total (%)	Media geom. Survivina	<i>p</i>	Media geom. EPRI	<i>p</i>
Pacientes	60	60		60	
Edad media	65.5±17.8				
Edad al diagnóstico			0.9		0.9
≤ 50	24 (40%)	5.4		2.8	
> 50	36 (60%)	5.3		3.1	
Tipo histológico			0.2		0.7
Ductal	45 (75%)	5.6		3.2	
Lobulillar	7 (11.7%)	2.7		1.5	
Otro	8 (13.3%)	9.5		2.8	
Grado histológico			0.3		0.4
1	10 (16.6%)	4.5		3.2	
2	15 (25%)	2.8		1.8	
3	35 (58.4%)	6.7		4.3	
Estadio tumoral			0.9		0.9
I	5 (8.3%)	5.5		1.6	
II	40 (66.7%)	4.6		2.5	
III	15 (25%)	5.4		2	
Tamaño tumoral			0.7		0.6
< 2 cm	25 (41.6%)	5.8		2.4	
≥ 2 cm	35 (58.4%)	5.1		3.3	
Invasión vascular			0.09		0.9
No	35 (58.3%)	7.1		3	
Si	25 (41.7%)	3.9		2.9	
Afectación ganglionar			0.9		0.15
< 3 nódulos	49 (81.7%)	5.5		2.3	
≥ 3 nódulos	11 (18.3%)	5.1		6.8	
Receptores de estrógenos			0.6		0.025
Negativo	12 (20%)	6.1		8.5	
Positivo	48 (80%)	4.6		1.6	
Receptor de progesterona			0.008		0.005
Negativo	22 (36.7%)	2.6		6.3	
Positivo	38 (63.3%)	0.98		1.15	
Índice proliferativo			0.16		0.35
Negativo	27 (45%)	2.3		1.4	
Positivo	33 (55%)	5.2		2.9	
erb-B2			0.038		0.6
Negativo	30 (50%)	3.2		2	
Positivo	30 (50%)	8		2.7	

3.6 Survivina induce modificaciones epigenéticas en el promotor de p73

El incremento de expresión de las distintas isoformas de *p73* en las líneas celulares analizadas cuando se introduce survivina exógena, junto con la descripción en *C.elegans* de que BIR-1, homólogo de survivina, introduce cambios en la acetilación de la cromatina afectando a la expresión de distintos genes (Kostrouchova, Kostrouch et al. 2003), nos llevó a evaluar si un mecanismo similar pudiera estar ocurriendo en las células humanas. Este estudio se realizó por un ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina.

En la línea celular de colon SW480-ADH se observó un aumento de la trimetilación [H3K4me3] y de la acetilación [H4K16ac] en el promotor 1 de *p73* (Figura 17A) en las células con expresión ectópica de survivina con respecto a las mismas células transfectadas con el vector vacío. Además el análisis en estas mismas células del promotor 2 de *p73* reveló un aumento de la acetilación (Figura 17B) en las células transfectadas con survivina. No se observó un incremento en los niveles de trimetilación.

En la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-453 se observó un aumento tanto de la trimetilación como de la acetilación en las células con expresión ectópica de survivina (Figura 18). Este aumento resultó significativamente mayor que en las células de colon.

Figura 17. Cambios epigenéticos en la línea celular de cáncer de colon SW480-ADH en el promotor 1 (A) y en el promotor 2 (B) del gen *p73*. Las células fueron transfectadas ectópicamente con el vector vacío (Vector) o con el mismo vector conteniendo a *survivina* (Survivina). Los anticuerpos contra H3K4me3 y H4K16ac se utilizaron para evaluar con un ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) cambios en estas marcas de activación de la transcripción. Como control negativo del ensayo no se usó ningún anticuerpo (No anticuerpo) y como control positivo se usó el anticuerpo contra la histona 3 total (H3total). Por PCR a tiempo real se amplificaron los distintos fragmentos de los promotores de *p73*. Los valores de la PCR cuantitativa fueron normalizados respecto a los niveles de GAPDH. Los datos representan la media y desviación estándar de dos experimentos independientes.

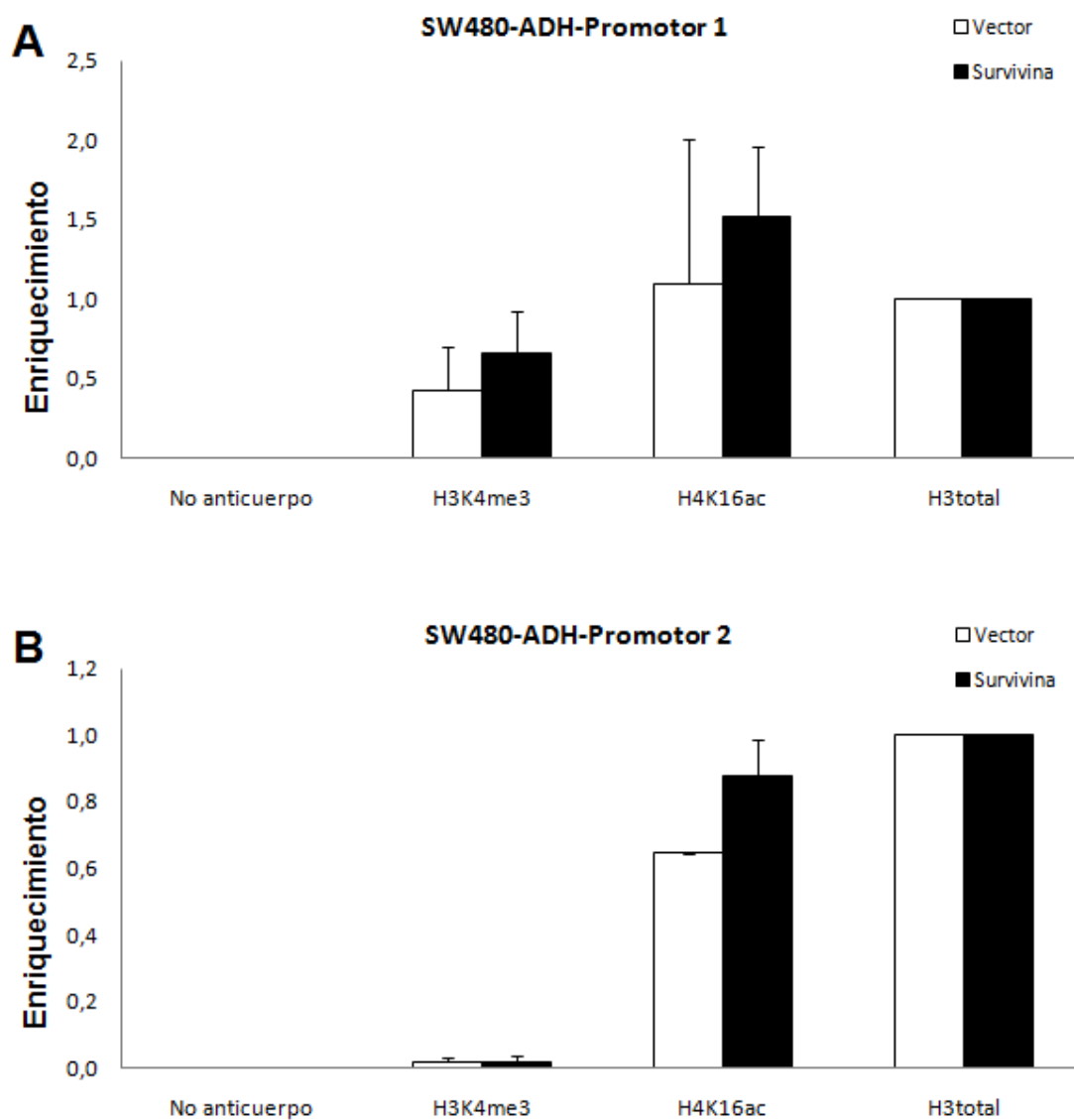
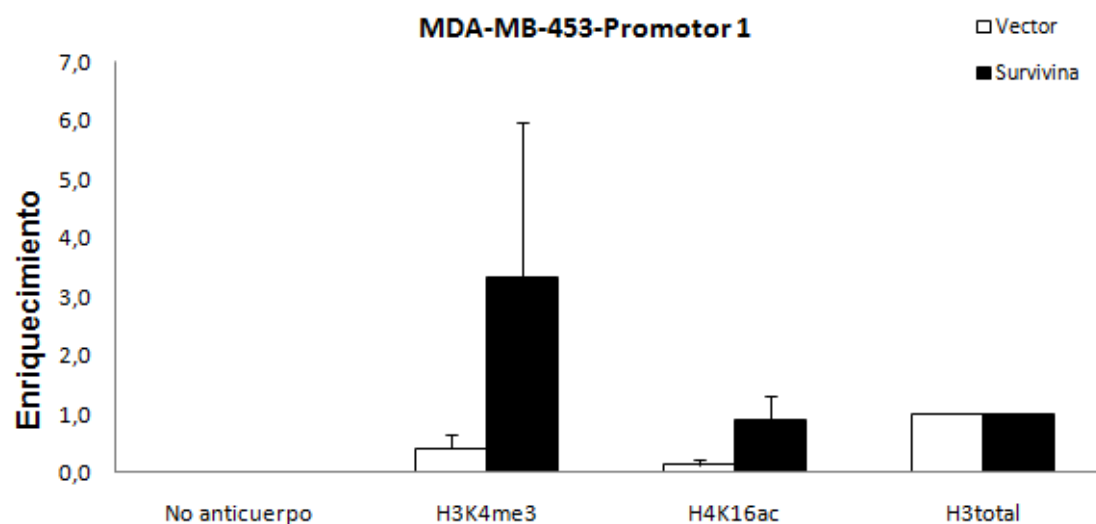


Figura 18. Cambios epigenéticos en la línea celular de cáncer de mama en el promotor 1 del gen *p73*. Las células fueron transfectadas ectópicamente con el vector vacío (Vector) o con el mismo vector conteniendo a *survivina* (Survivina). Los anticuerpos contra H3K4me3 y H4K16ac se utilizaron para evaluar con un ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) cambios en estas marcas de activación de la transcripción. Como control negativo del ensayo no se usó ningún anticuerpo (No anticuerpo) y como control positivo se usó el anticuerpo contra la histona 3 total (H3total). Por PCR a tiempo real se amplificaron los distintos fragmentos de los promotores de *p73*. Los valores de la PCR cuantitativa fueron normalizados respecto a los niveles de GAPDH. Los datos representan la media y desviación estándar de dos experimentos independientes.



4. IMPLICACIÓN DE LAS ISOFORMAS DE *p73* EN PROCESOS DE QUÍMIO-RESISTENCIA

4.1 *Correlación entre la expresión de las isoformas de p73 y sus genes diana con el pronóstico de los pacientes con cáncer de colon*

El periodo de seguimiento de nuestra serie fue el intervalo desde la cirugía y el tiempo hasta la última visita o muerte del paciente. En Octubre de 2009, la serie tenía una mediana de seguimiento de 70 meses (rango del seguimiento de 3-104 meses). Durante este periodo tuvieron lugar 19 recaídas (24.3%) y 21 muertes totales (27%).

4.1.1 Asociación con la supervivencia libre de enfermedad

Se realizaron los análisis de Kaplan-Meier y univariante para determinar la influencia del estadio y de los niveles de expresión de las isoformas de *p73* en la SLE. No se observaron asociaciones estadísticas entre los niveles de las variantes de *p73* y la SLE. Como se esperaba, el estadio tumoral se correlacionaba en ambas aproximaciones estadísticas con la SLE ($p = 0.002$ y $p = 0.02$ para Kaplan-Meier y para el análisis univariante, respectivamente). Los pacientes con estadio III presentan una SLE a los 5 años del 59.6% (95% CI, 36.3%-82.9%), los pacientes con estadio II del 76.4% (95% CI, 57.6%-95.2%) y aquellos con estadio I del 100%. En el análisis multivariante el estadio patológico se mantiene como una variable independiente de predicción de la SLE ($p = 0.015$).

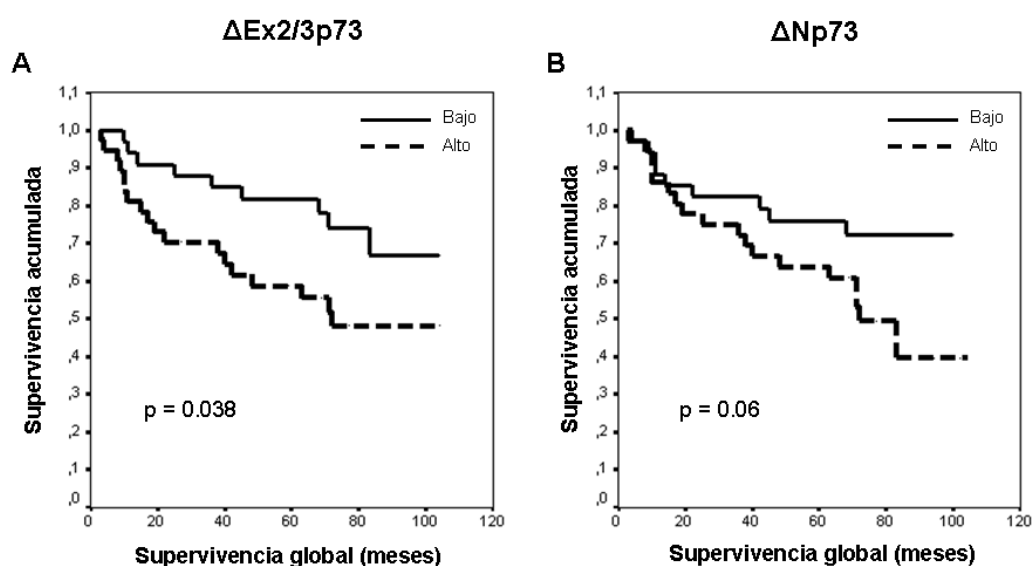
4.1.2 Asociación con la supervivencia global

La SG de nuestra serie a los 5 años de seguimiento fue del 57%, (95% CI, 43.5%-70.5%).

En los análisis de Kaplan-Meier y univariante, el estadio tumoral se correlacionó con la SG ($p < 0.0001$ y $p < 0.0001$, respectivamente). Los pacientes en el estadio IV representaban una SG a los 5 años del 20% (95% CI, 0%-55.1%), los pacientes en III del 32.4% (95% CI, 10.3%-54.5%), los pacientes en estadio II del 76.7% (95% CI, 62.4%-91%) y aquellos en el estadio I del 87.7% (95% CI, 64.6-100%). El análisis de Kaplan-Meier reveló una asociación entre la SG y la expresión de $\Delta Ex2/3p73$ cuando sus niveles fueron divididos en bicentiles ($p = 0.038$) (Figure 19A). Los pacientes con baja expresión de $\Delta Ex2/3p73$ presentaban una SG a los 5 años del 66.8% (95% CI, 47.2%-86.4%) mientras que los pacientes con niveles altos del 48.2% (95% CI, 31.1%-

65.3%) (Figure 19B). Se observó una tendencia para la expresión de $\Delta Np73$ ($p = 0.06$). Los pacientes con baja expresión representaban una SG a los 5 años del 72.4% (95% CI, 56.9%-87.9%) mientras que aquellos con niveles altos del 39.6% (95% CI, 17.3%-61.9%).

Figura 19: La influencia de los niveles de las variantes $\Delta Ex2/3p73$ (A) y $\Delta Np73$ (B) en la supervivencia global (SG), curvas de Kaplan-Meier y valores p . La expresión se distribuyó en niveles bajos y altos según la mediana.



4.2 Correlación entre la expresión de las isoformas de p73 y los niveles de ARNm de genes diana de p73 relacionados con resistencia a drogas

Se encontraron correlaciones estadísticas directas entre los niveles de expresión de $\Delta Ex2p73$, $\Delta Ex2/3p73$ y $\Delta Np73$ y *HMG1* (Tabla 11). Además observamos una tendencia entre los niveles de expresión de $\Delta Ex2p73$, $\Delta Ex2/3p73$ y $\Delta Np73$ y *MDR1* (Tabla 11).

Tabla 11. Correlaciones entre los niveles de expresión de las isoformas de p73 y *HMG1*, *MDR1* y *Caspasa-1* para los pacientes con cáncer de colon

	$\Delta Ex2p73$	$\Delta Ex2/3p73$	$\Delta Np73$	<i>TAp73</i>
<i>HMG1</i>	$p > 0.0001$ $r=0.4$	$p = 0.012$ $r=0.28$	$p = 0.04$ $r=0.23$	<i>ns</i>
<i>MDR1</i>	$p = 0.06$ $r = 0.28$	$p = 0.08$ $r = - 0.25$	$p = 0.08$ $r=0.25$	<i>ns</i>
<i>caspasa-1</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

La p se calculó por el análisis de varianza (ANOVA); r es el coeficiente de Pearson .
ns, correlación estadística no significativa.

4.3 Correlación entre los genes diana de p73 relacionados con resistencia a drogas y el pronóstico de los pacientes

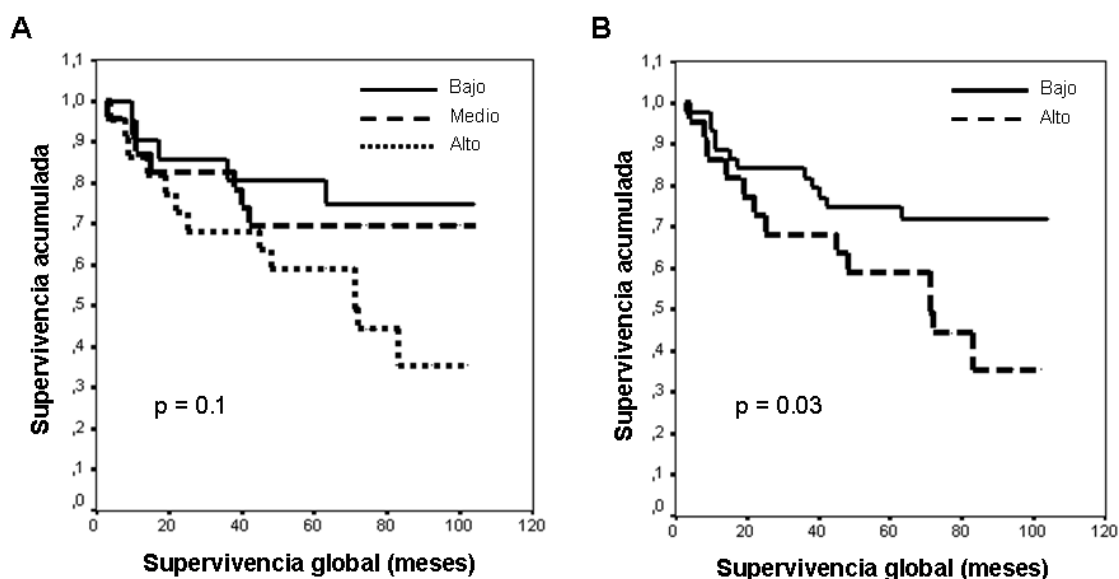
4.3.1 Correlación con la supervivencia libre de enfermedad

Se llevaron a cabo análisis de Kaplan-Meier y univariante para determinar el impacto de los niveles de *MDR1*, Caspasa-1 y *HMG1* en la SLE. No se observaron asociaciones estadísticas.

4.3.2 Correlación con la supervivencia global

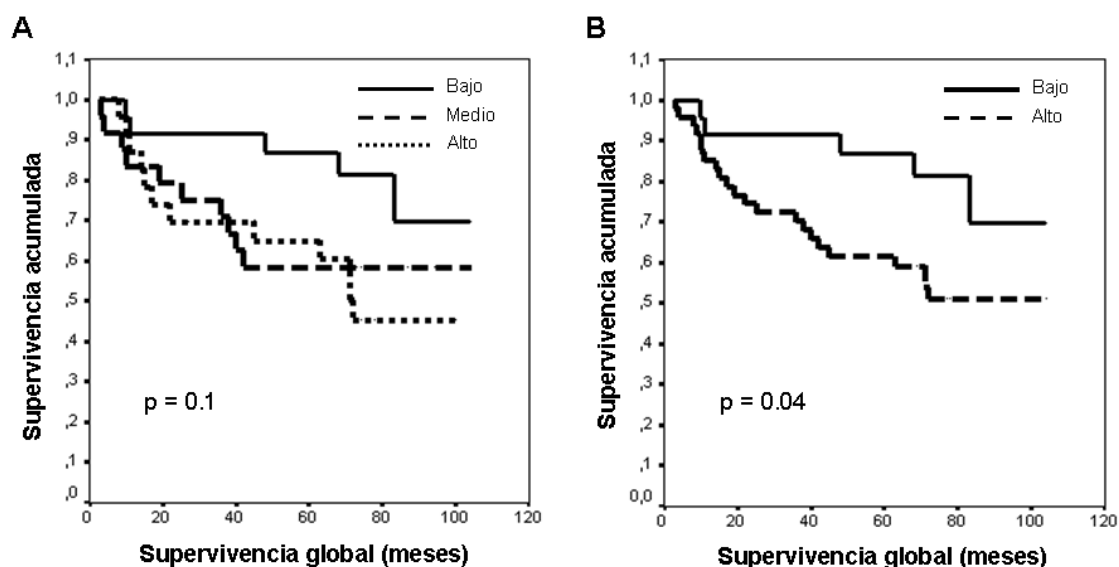
Los pacientes fueron divididos en terciles en base a los niveles de *MDR1*, *Caspasa-1* y *HMG1*. No se observaron asociaciones para la expresión de *MDR1* ($p = 0.1$). Los pacientes con baja expresión presentaban una SG a los 5 años del 74.9% (95% CI, 55.7%-94.1%), los pacientes con niveles medios de expresión del 69.6% (95% CI, 50.8%-88.4%) y aquellos con los niveles más altos del 35.5% (95% CI, 12.6%-58.4%) (Figure 20A). La gráfica de Kaplan-Meier reveló un comportamiento similar entre los terciles de niveles de expresión de *MDR1* medios y bajos (Figura 20A). Así, estos pacientes fueron agrupados, y los posteriores análisis se llevaron a cabo con sólo estas dos categorías, niveles de expresión bajos (nueva variable que agrupa a pacientes con expresión baja y media de *MDR1*) o niveles de expresión altos de *MDR1*. Cuando la SG fue analizada en estos 2 grupos se observó una diferencia estadísticamente significativa, los pacientes con una expresión baja de *MDR1* mostraron una SG a los 5 años del 71.8% (95% CI, 58.3%-85.3%) mientras que los pacientes con una alta expresión del 35.5% (95% CI, 12.6%-58.4%) ($p = 0.03$) (Figure 20B).

Figura 20: Influencia de los niveles de *MDR1* en la supervivencia global (SG), curvas de Kaplan-Meier y valores de *p*. (A) Expresión de *MDR1* en pacientes con cáncer de colon distribuida en terciles (niveles bajos, medianos y altos). (B) Expresión de *MDR1* en pacientes con cáncer de colon distribuida en dos grupos, expresión baja (nueva variable que combina aquellos pacientes con niveles bajos y medios) y alta.



Igualmente, no se observó ninguna correlación para la expresión de *HMGI* ($p = 0.1$). Los pacientes con baja expresión representaban una SG a los 5 años del 69.7% (95% CI, 44.2%-95.2%), los pacientes con niveles medios del 45.2% (95% CI, 24%-66.4%) y aquellos con los niveles más altos del 58.3% (95% CI, 38.5%-78.1%) (Figura 21A). La gráfica de Kaplan-Meier reveló un comportamiento similar de los terciles medios y altos (Figura 21A). Así, de manera similar a la expresión de *MDR1*, estos pacientes fueron agrupados, y los siguientes análisis se llevaron a cabo con sólo estas 2 categorías, niveles de expresión altos o bajos de *HMGI*. Cuando la SG fue analizada en estos dos grupos se observó una diferencia significativa, los pacientes con baja expresión de *HMGI* mostraron una SG a los 5 años del 69.7% (95% CI, 44.2%-95.2%) y aquellos con alta expresión del 51% (95% CI, 36.1%-65.9%) ($p = 0.04$) (Figura 21B).

Figura 21: Influencia de los niveles de *HMGI* en la supervivencia global (SG), curvas de Kaplan-Meier y valores de *p*. (A) Expresión de *HMGI* en pacientes con cáncer de colon distribuida en terciles (niveles bajos, medios y altos). (B) Expresión de *HMGI* distribuida en dos grupos: expresión alta (nueva variable que combina los niveles medios y altos) y baja.



Se encontraron resultados similares en el análisis univariante, observándose que los niveles de expresión de *MDR1* y *HMGI* podrían ser un factor estadístico de predicción de la SG ($p = 0.04$ y $p = 0.05$, respectivamente).

El análisis multivariante mostró que estadio tumoral, *MDR1* y *HMGI* presentaban valor predictivo independiente de la SG (Tabla 12).

Tabla 12: Análisis univariante y multivariante de la asociación entre la expresión de las isoformas de *p73*, *MDR1*, *HMG1*, *caspasa-1* y las características clínico-patológicas con la supervivencia global de los pacientes con cáncer de colon. Las celdas en blanco corresponden a variables que no mostraron relación con la SG en el análisis multivariante.

Variable	Categoría	Análisis univariante			Análisis multivariante		
		HR	(95% CI)	<i>p</i>	HR	(95% CI)	<i>p</i>
Estadio	I vs II	1.6	0.19-12.86	0.66	0.57	0.06-5.5	0.63
	I vs III	8.8	1.13-68.5	0.037	7.18	0.86-60.1	0.069
	I vs IV	75.6	7.47-764.8	<0.0001	26.5	2.42-289.9	0.007
Invasión vascular	Si vs No	5.13	2.23-11.81	<0.0001			
Diferenciación tumoral	Bien vs Pobre	2.29	0.83-6.3	0.11			
	Moderado vs Pobre	1.69	0.21-13.64	0.62			
Afectación ganglionar	Si vs No	7.23	3.19-16.37	<0.0001			
Expresión $\Delta Ex2p73$	Bajo vs alto	1.53	0.7-3.35	0.28			
Expresión $\Delta Ex2/3p73$	Bajo vs alto	2.28	1.02-5.1	0.044			
Expresión $\Delta Np73$	Bajo vs alto	2.1	0.94-4.68	0.07			
Expresión <i>Tap73</i>	Bajo vs alto	0.73	0.34-1.56	0.4			
Expresión <i>MDR1</i>	Bajo vs alto	2.28	1.04-4.99	0.04	4.5	1.48-13.92	0.008
Expresión <i>HMG1</i>	Alto vs bajo	2.61	0.99-6.9	0.05	6.25	1.61-24.19	0.008
Expresión <i>caspasa-1</i>	Bajo vs alto	0.70	0.31-1.57	0.39			

DISCUSIÓN

1. ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE LAS DISTINTAS ISOFORMAS DE *p73* EN CÁNCER DE COLON Y MAMA

Aunque las mutaciones en el gen *p53* son las alteraciones más frecuente en los tumores humanos, estas son raras en su homólogo *p73*, siendo el aumento de su expresión un evento común en una gran variedad de neoplasias malignas humanas (Sunahara, Ichimiya et al. 1998; Chi, Chang et al. 1999; Tannapfel, Wasner et al. 1999; Dominguez, Silva et al. 2001a; Dominguez, Silva et al. 2001b). La asociación de la sobreexpresión de *p73* con estadios tumorales avanzados y/o con otros parámetros de mal pronóstico (Tannapfel, Wasner et al. 1999; Dominguez, Silva et al. 2001b) podría apoyar su papel en el proceso tumorigénico. La reciente descripción de variantes de *p73* con el amino terminal truncado ($\Delta TAp73$) con funciones opuestas al supresor tumoral *p53* y a las variantes de *p73* que lo mantienen (*TAp73*) nos llevaron a realizar un análisis detallado y exhaustivo de los niveles de expresión de estas isoformas en el tejido normal y tumoral de pacientes diagnosticados de cáncer de colon y mama. Concretamente, en esta parte del estudio cuantificamos los niveles de las variantes de *p73* que conservan el dominio de transactivación, *TAp73*, y de las isoformas con el amino terminal truncado $\Delta TAp73$ ($\Delta Ex2p73$, $\Delta Ex2/3p73$ y $\Delta Np73$), en las dos series de pacientes comentadas. Aunque los niveles de expresión de las distintas isoformas de *p73* se ha descrito que varían mínimamente entre tejidos normales de distintos órganos (Concin, Becker et al. 2004), la disponibilidad de tumor y su correspondiente tejido normal para realizar este estudio proporciona una buena oportunidad para un análisis más ajustado de los cambios de expresión en los tumores.

Tantos las isoformas oncogénicas como las supresoras se encontraron sobreexpresadas en un número significativo de los carcinomas de colon y mama examinados, indicando su posible participación en la tumorigénesis de estos tejidos. El hallazgo de que los niveles de expresión de las variantes analizadas se correlacionan directamente entre ellas es sorprendente y podría indicar que ambos promotores están regulados por los mismos estímulos. Un análisis de la formación funcional de heterocomplejos entre las variantes supresoras tumorales y oncogénicas de *p73* y como su estequiometría podría estar influenciada por los cambios de sus niveles de expresión en tumores humanos es crucial para comprender su papel supresor tumoral u oncogénico.

Se ha especulado que la presencia de variantes $\Delta TAp73$, incluso en niveles bajos, anule completamente la actividad de transactivación de las formas $TAp73$, con la consiguiente supresión de su función anti-tumorigénica. Adicionalmente, se ha descrito que a nivel proteico las isoformas $\Delta TAp73$ son más estables que las isoformas $TAp73$ (Grob, Novak et al. 2001; Stiewe, Theseling et al. 2002), lo que iría a favor de un ambiente oncogénico cuando estas están presentes.

En nuestras muestras de carcinomas de colon y mama, se observaron algunas asociaciones entre la expresión de p53 nativo y sobreexpresión de isoformas específicas de $p73$, lo que apoyaría la participación de ambas proteínas en la misma vía funcional, ya que, teóricamente, dos alteraciones diferentes en la misma ruta no confieren ventajas adicionales en el crecimiento durante el proceso tumorigénico, aliviándose de esta forma la presión selectiva sobre las células que albergan ambas alteraciones. Dicha asociación también se observó en un estudio anterior en el que se analizaron los niveles de expresión total de $p73$ (Dominguez, Silva et al. 2001a). El hecho de que p53 nativo se asocie con la sobreexpresión de las variantes de $p73$ sugiere la implicación de las variantes de $p73$ en la inactivación de la vía de p53 *in vivo*, actuando como un oncogén. Se pensaba que la sobreexpresión de $p73$ nativo constituía un mecanismo para compensar la inactivación de $p53$, un contexto en el que $p73$ podría realizar las actividades de p53. Sin embargo, esa asociación no ha sido observada (sobreexpresión de $p73$ y $p53$ mutado), lo que sugiere que $p73$ podría no desempeñar un papel de supresor tumoral.

$\Delta Np73$ es la única isoforma de $p73$ generada a partir del segundo promotor alternativo (Figura 3). Este promotor críptico puede ser activado por p53 nativo y por las isoformas $TAp73$ (Grob, Novak et al. 2001; Kartasheva, Contente et al. 2002). La sobreexpresión de la variante específica $\Delta Np73$ observada en nuestras series podría ser debido a la activación de este segundo promotor debido al aumento de los niveles de formas $TAp73$ en las muestras de tumor de colon y mama. En nuestra serie de mama, la asociación que se encuentra entre p53 nativo y la sobreexpresión de la isoforma $\Delta Np73$ también podría deberse a la transactivación del promotor de $\Delta Np73$ por p53.

In vitro, la isoforma específica $\Delta Np73$ da lugar a la inmortalización de fibroblastos primarios y les rescata de la senescencia inducida por *ras*; es más, coopera con *ras* oncogénico en su transformación *in vivo* (Petrenko, Zaika et al. 2003). Nosotros hipotetizamos que *ras* oncogénico y la sobreexpresión de la variante $\Delta Np73$ podrían ser

alteraciones comunes adquiridas de forma consecutiva durante la tumorigénesis humana. En nuestras series de tumor de colon y mama no pudimos confirmar nuestra hipótesis ya que no se encontró una asociación estadística entre *K-ras* activado y la sobreexpresión de $\Delta Np73$, ni de las restantes variantes de *p73*. Luego, en la tumorigénesis humana de colon y de mama, la variante $\Delta Np73$ quizás cooperaría con otros oncogenes en el proceso de transformación. La identificación de oncogenes que pueden cooperar con la isoforma específica $\Delta Np73$ podría ayudar a identificar a individuos en la población general con un riesgo mayor a desarrollar cáncer.

Del análisis de nuestras series de cáncer de colon y mama se obtuvieron algunos resultados novedosos. No se observó una correlación entre los niveles de expresión de *E2F-1* y $\Delta Np73$, lo que sugiere que el promotor intrónico alternativo de *p73* puede no estar regulado directamente por E2F-1 (Stiewe, Tuve et al. 2004). Sin embargo, se encontraron algunas correlaciones entre los niveles de ARNm de *E2F-1* y las variantes de *p73* que derivan del primer promotor. Estas correlaciones podrían explicarse de diferentes maneras. Mientras que el primer promotor de *p73* es una diana conocida de E2F (Seelan, Irwin et al. 2002), las isoformas $\Delta TAp73$ pueden asimismo inactivar a la proteína supresora de tumores pRb, dando lugar a la liberación de E2F (Stiewe, Stanelle et al. 2003). Basándonos en nuestros resultados, es difícil saber si E2F-1 activa la expresión de las variantes de *p73* derivadas del primer promotor o si la sobreexpresión de E2F-1 es una consecuencia de la inactivación de pRb por las formas $\Delta TAp73$. Sin duda, podría existir un mecanismo de retroalimentación positiva entre ambas proteínas.

Los cánceres de colon y mama son dos de las neoplasias más frecuentes en las sociedades occidentales y están asociados con altas tasas de mortalidad. En este contexto, la búsqueda de marcadores moleculares que puedan ayudar bien a detectar la enfermedad en estadios tempranos o bien a predecir el comportamiento del tumor y su respuesta a terapia es de extrema importancia. Así, el significado clínico de la sobreexpresión de las variantes de *p73* en estos tipos tumorales es de particular interés. La asociación entre la sobreexpresión de las isoformas de *p73* con características tumorales clásicamente asociadas con un peor pronóstico de los pacientes podría destacar su papel como oncogenes. En nuestra serie de cáncer de colon, la sobreexpresión de las variantes *p73* se asociaron con estadios tumorales avanzados, con afectación ganglionar, invasión vascular, presencia de pólipos, y localización tumoral (Tabla 6). La asociación más relevante es la observada entre la sobreexpresión de

$\Delta Ex2/3p73$ y $\Delta Np73$ con estadios avanzados; específicamente, los niveles de expresión de $\Delta Ex2/3p73$ fueron significativamente mayores en el estadio IV y los niveles de $\Delta Np73$ incrementaron en paralelo con el estadio. Luego, $\Delta Ex2/3p73$ y $\Delta Np73$ podrían ser marcadores del potencial maligno en este tipo tumoral. Actualmente, el estadio patológico es el factor pronóstico que tiene una utilidad clínica más claramente demostrada en cáncer colon, con una supervivencia a los 5 años para los estadios I cercana al 90% que contrasta fuertemente con los pacientes en estadio IV cuya supervivencia a los cinco años es menor del 10% (Cohen AM 1997). En un estudio reciente en cáncer de pulmón, el porcentaje de pacientes que mostró una expresión positiva de la forma oncogénica $\Delta Np73$ fue mayor para el estadio III y se asoció con una supervivencia menor a los cinco años (Uramoto, Sugio et al. 2004). Además, la expresión de la isoforma $\Delta Np73$ es un factor que predice una mala evolución en pacientes con neuroblastoma (Casciano, Mazzocco et al. 2002).

Es interesante la asociación observada entre los pacientes que muestran una sobreexpresión de $\Delta Ex2p73$ o $TAp73$ y la localización del tumor en el recto. Se han definido dos vías para la carcinogénesis de colon: la supresora y la mutadora. Los pacientes con el fenotipo mutador se caracterizan por la inactivación de los genes de reparación mismatch, en consecuencia presentan inestabilidad de microsátélites, localizándose los tumores preferentemente en el colon derecho (Chaves, Cruz et al. 2000). Quizás la sobreexpresión de esas dos variantes de $p73$ podría ayudar a identificar tumores de colon derivados de la vía supresora.

La asociación más notable encontrada en nuestra serie de cáncer de mama es la correlación entre los niveles de expresión de las isoformas de $p73$ y los receptores hormonales (Tabla 7). Las asociaciones observadas entre la sobreexpresión de $\Delta Ex2p73$ y receptores de estrógeno negativos, y entre $TAp73$ y receptores de progesterona negativos indican que la expresión de estas variantes podría utilizarse como un marcador para la idoneidad de la paciente para la terapia hormonal. Por otra parte, la asociación observada entre $\Delta Ex2p73$ y $\Delta Np73$ y la invasión vascular destaca el posible papel oncogénico de las variantes de $p73$ con el dominio de transactivación truncado en la carcinogénesis de mama.

La sobreexpresión de las variantes supresoras tumorales $TAp73$ en ambas series de colon y mama se asoció con ciertas características asociadas con mal pronóstico. Esto podría explicarse por el hecho de que las formas supresoras tumorales $TAp73$ y las

oncogénicas $\Delta TAp73$ son coexpresadas en las muestras del tumor y, aunque las isoformas $TAp73$ se encuentren sobreexpresadas, las oncogénicas, incluso en bajos niveles, podrían anular su función supresora, dando lugar a una actividad prevalentemente oncogénica.

Las variantes con el amino terminal truncado pueden sufrir en su carboxilo terminal un procesamiento alternativo (Figura 3). Esta región contiene un dominio SAM (sterile alpha motif) y un dominio rico en prolinas (Arrowsmith 1999; Ozaki, Naka et al. 1999). El dominio SAM está implicado en las interacciones proteína-proteína y está presente en proteínas cuyas funciones varían desde la transducción de señales hasta la represión transcripcional (Arrowsmith 1999). $p73\alpha$, $p73\epsilon$ y $p73\zeta$ contienen dominios SAM (Arrowsmith 1999). $p73\alpha$ transactiva genes diana de p53 en menor medida que $p73\beta$, lo que sugiere que el dominio SAM de p73 está involucrado en la regulación transcripcional (Zaika, Kovalev et al. 1999). Un estudio que cuantificara los niveles de expresión de variantes específicas que tuvieran simultáneamente procesamientos alternativos en las regiones terminales 3' y 5' en tejidos humanos podría revelar cómo el procesamiento alternativo del carboxilo terminal modula la actividad de p73 y qué combinaciones amino y carboxilo terminal están involucradas en la tumorigénesis. Si mostrar un amino terminal truncado implica una deficiencia de transactivación, el procesamiento del carboxilo terminal podría tener poco efecto sobre la función de la proteína. Por desgracia, es difícil realizar tal estudio.

En conclusión, la asociación entre la sobreexpresión de las variantes $\Delta TAp73$ con características tumorales de peor pronóstico sugiere su posible papel oncogénico y su posible utilidad en el ámbito clínico como marcadores de la evolución de los pacientes con cáncer. Este es el caso de las isoformas $\Delta Ex2/3p73$ y $\Delta Np73$, cuya sobreexpresión en pacientes con cáncer de colon se asocia con estadios patológicos avanzados. Un seguimiento de nuestras series de pacientes para confirmar la asociación de la sobreexpresión de las isoformas $\Delta Ex2/3p73$ y $\Delta Np73$ con supervivencias más cortas de los pacientes era obligada y nos llevó a realizar el trabajo que ya hemos detallado en este trabajo de tesis y que discutimos más adelante. En este contexto, un paso más será la consideración del tratamiento que estos pacientes recibieron para determinar si la sobreexpresión de estas variantes son pronósticas de la evolución clínica de los pacientes o si son predictivas de los distintos beneficios de terapias específicas. El estatus inmunohistoquímico de p53 se incluye extensamente en las

historias médicas de los pacientes de cáncer. Sin embargo, la acción modificadora que las variantes $\Delta TAp73$ podrían ejercer sobre p53 sugiere que el análisis de los niveles de las isoformas de $p73$ se debería considerar.

2. IMPLICACIÓN DE LAS ISOFORMAS DE *p73* EN EL PROCESO ANGIOGÉNICO EN CÁNCER DE COLON

Existen datos controvertidos en la literatura acerca del papel de *p73* en la regulación de los niveles de *VEGF*. Mientras algunos resultados apuntan a *p73* como un represor de *VEGF*, otras publicaciones confieren a *p73* la función de inductor de *VEGF*. Con estos resultados, nuestra hipótesis de partida contemplaba que las variantes supresoras tumorales de *p73* podrían reprimir la expresión de *VEGF* y las oncogénicas podrían inducirla. Sin embargo, nuestros resultados no apoyan esta hipótesis inicial. Hemos observado que la expresión de ambas isoformas, supresoras tumorales y oncogénicas, se correlacionan directamente con los niveles de *VEGF* (Tabla 9, Figuras 8a y 8b), lo que sugiere que las isoformas de *p73* podrían actuar como inductoras de *VEGF*. Aunque se analizó un número pequeño de casos, una correlación similar se observó cuando se consideraron los niveles de proteína de *VEGF*, en lugar de los de ARNm. Como *VEGF* y *VEGF_{165b}* derivan del mismo promotor, analizamos si *VEGF_{165b}* podría también ser regulada por las variantes de *p73*. En nuestro trabajo hemos encontrado igualmente correlaciones directas entre la expresión de *VEGF_{165b}* y los niveles de las distintas variantes de *p73* (Tabla 9, Figuras 8e-8h). Este dato apoya el hecho de que las isoformas de *p73* podrían también inducir la isoforma anti-angiogénica de *VEGF*. No existen datos previos en la literatura que describan este hallazgo *in vivo* o *in vitro*.

PEDF ha sido descrito en algunos sistemas biológicos como un inhibidor de la angiogénesis (Dawson, Volpert et al. 1999; Doll, Stellmach et al. 2003; Garcia, Fernandez-Garcia et al. 2004; Matsumoto, Ishikawa et al. 2004) y la disminución de su expresión implicada en la progresión tumoral (Guan, Yam et al. 2003; Uehara, Miyamoto et al. 2004). Curiosamente, los niveles de expresión de *PEDF* podrían ser modulados por *p73* (Sasaki, Naishiro et al. 2005). En nuestra serie de cáncer de colon observamos una correlación inversa entre los niveles de $\Delta Ex2p73$ y *PEDF* en el grupo de pacientes con niveles más bajos de $\Delta Ex2p73$ (Tabla 9), lo que sugiere que esta isoforma podría regular negativamente los niveles de *PEDF*. Dado que esta asociación solo se observa en aquel grupo de enfermos con niveles más bajos de $\Delta Ex2p73$, esta regulación podría ser dependiente de estos niveles.

Además, se ha descrito que *PEDF* inhibe la expresión de *VEGF* en células de osteosarcoma (Takenaka, Yamagishi et al. 2005) y que *VEGF* induce a *PEDF* en células

de carcinoma oral de células escamosas (Miyagishi, Ohno-Matsui et al. 2003). La conexión funcional entre las dos proteínas podría ser específica de tejido. Nuestros datos muestran una correlación directa de sus niveles de expresión de ARNm (Figura 10a), lo que sugiere que los niveles de *VEGF* pueden ser inducidos por *PEDF* o viceversa. Un mecanismo de retro-alimentación positivo puede también existir. El hecho de que esta correlación sea observada sólo en los grupos de pacientes que muestran altos niveles de las variantes de *p73* apoya la idea de que la expresión de ambos ARNm podría estar modulada por los niveles de las isoformas de *p73* (Figuras 10b-10d).

La inactivación de *p53* se ha asociado con la sobreexpresión de *VEGF* (Mukhopadhyay, Tsiokas et al. 1995). Aunque tal asociación no ha sido observada en nuestra serie, una asociación interesante se encontró entre *p53* mutado y la sobreexpresión de *VEGF_{165b}* (Figura 11a). En este contexto, la sobreexpresión *VEGF_{165b}* podría ser un mecanismo para compensar la falta de *p53* y así controlar el crecimiento celular. Otros eventos oncogénicos como la activación de *K-ras* también podrían conducir a la sobreexpresión de *VEGF* o a la disminución de *PEDF* (Rak, Filmus et al. 1995; Vilorio-Petit, Miquerol et al. 2003). Nuestros datos corroboran que *K-ras* oncogénico puede negativamente regular la expresión de *PEDF in vivo* contribuyendo al proceso de angiogénesis (Figura 11b).

VEGF podría modular la proliferación neuronal a través de la regulación de los niveles de los miembros de la familia de factores de transcripción *E2F* (Zhu, Jin et al. 2003). No existen en la literatura datos similares en otros contextos biológicos. Nosotros observamos en nuestra serie de cáncer de colon una correlación directa entre los niveles de expresión de *VEGF* y *E2F-1* (Tabla 9), lo que apoya que en el proceso carcinogénico *VEGF* podría también promover la proliferación celular a través de la sobreexpresión de *E2F-1*.

La asociación entre la sobreexpresión de *VEGF* y parámetros de peor pronóstico está bien documentada (Takebayashi, Aklyama et al. 1996; Tokunaga, Oshika et al. 1998; Vermeulen, Van den Eynden et al. 1999; Paradis, Lagha et al. 2000; Gasparini 2001). En nuestra serie observamos una correlación entre la sobreexpresión de *VEGF* y la presencia de pólipos en el espécimen quirúrgico y estadios avanzados. Es notable que aunque la disminución de *VEGF_{165b}* ha sido previamente observada en cánceres humanos de riñón y próstata (Bates, Cui et al. 2002; Woolard, Wang et al. 2004), su asociación con peor pronóstico está poco documentado en la literatura. Sólo datos muy

recientes describen la asociación entre la disminución de $VEGF_{165b}$ y la extensión del tumor en pacientes con melanoma primario (Pritchard-Jones, Dunn et al. 2007). Así, estudios que evalúen esta asociación podrían subrayar el papel de $VEGF_{165b}$ como proteína supresora tumoral y como un marcador de pronóstico tumoral. En nuestra serie de cáncer de colon observamos una asociación entre la disminución de $VEGF_{165b}$ y estadios avanzados del tumor, invasión vascular y afectación ganglionar (Figura 12). Clásicamente, estos tres parámetros son los que con mayor robustez se asocian a un peor pronóstico de los pacientes con cáncer de colon y consecuentemente $VEGF_{165b}$ podría ser un marcador sensible de la expansión tumoral y metástasis.

Aunque también hemos observado correlaciones interesantes de $PEDF$ y los parámetros patológicos, las asociaciones encontradas para $VEGF_{165b}$ fueron más fuertes, indicando que $VEGF_{165b}$ podría ser un mejor marcador de pronóstico.

Como la mayoría de los estudios que analizan los niveles de $VEGF$ en muestras humanas fueron realizados con anterioridad a la descripción de las isoformas con propiedades putativas anti-angiogénicas, estos usaron oligos que cuantificaban ambas variantes, angiogénicas y anti-angiogénicas. Nosotros sugerimos utilizar cebadores específicos para la variante objeto de estudio en base a las diferencias que en este estudio observamos.

Queremos enfatizar que este es el primer trabajo en el que se analiza en muestras humanas la correlación de los niveles de expresión de $p73$ y $VEGF$ que tiene en cuenta las diferentes isoformas funcionales de ambos genes. Estudios previos evaluando tales correlaciones no consideraron ese hecho (Salimath, Marme et al. 2000; Vikhanskaya, Bani et al. 2001; Guan, Peng et al. 2003). En resumen, las isoformas de $p73$ podrían modificar *in vivo* los niveles de expresión de factores relacionados con la angiogénesis tales como $VEGF$, $VEGF_{165b}$ y $PEDF$. El ratio $VEGF/VEGF_{165b}-PEDF$ debe ser crítico para la capacidad angiogénica tumoral. Sin embargo, esta situación se complica, ya que podría existir un mecanismo de retroalimentación positiva entre $VEGF$ y $PEDF$. $VEGF$ podría mostrar funciones adicionales a través de la activación del factor $E2F-1$. Además hemos observado que el estrés oncogénico, como las mutaciones en $K-ras$, podrían disminuir $PEDF$, como previamente se ha descrito. Otras señales oncogénicas tales como la inactivación de $p53$ resultarían en mecanismos compensatorios tales como la sobreexpresión de $VEGF_{165b}$. Finalmente, $VEGF_{165b}$ podría funcionar como un supresor tumoral dada su asociación con parámetros patológicos de peor pronóstico y ser utilizado en el ámbito clínico como marcador molecular de malignidad.

3. MECANISMOS REGULADORES DE LA EXPRESIÓN DE *p73*

Hemos descrito que 1,25(OH)₂D₃ disminuye significativamente los niveles de ARNm y de proteína de survivina y TAp73 y de ARNm de $\Delta Np73$ en las células tumorales de colon, SW480-ADH, y de mama, MDA-MB-453 y MCF-7. Estos resultados muestran que 1,25(OH)₂D₃ puede regular negativamente a las isoformas oncogénicas y supresoras tumorales de *p73* y a survivina. El hecho de que no hayamos detectado la proteína $\Delta Np73$ no representa la falta de regulación de esta isoforma por 1,25(OH)₂D₃, sino que esta proteína está expresada en muy bajos niveles, como otros grupos han descrito previamente (Wang, Fukuda et al. 2004). Además, las líneas celulares SW480-ADH, MDA-MB-453, MCF-7, HCT116, H1299 y 293T transfectadas ectópicamente con survivina de manera transitoria ven incrementados entre 2-19 veces los niveles de ARNm de *TAp73*, $\Delta Np73$, $\Delta Ex2p73$ y $\Delta Ex2/3p73$. Estos datos confirman la regulación positiva de las isoformas de *p73* por *survivina*, y apoyan nuestra hipótesis inicial de que la regulación negativa de las variantes de *p73* por 1,25(OH)₂D₃ podría ser mediada por survivina (Figura 4). Con estos resultados tampoco podemos descartar que la disminución de los niveles de las isoformas de *p73* sea debido exclusivamente a la regulación negativa de survivina por 1,25(OH)₂D₃, así 1,25(OH)₂D₃ podría modular los niveles de *p73* de manera independiente de survivina. Curiosamente, Ma y colaboradores (Ma, Yu et al. 2008) han descrito recientemente la regulación positiva de *TAp73* por 1,25(OH)₂D₃ en un modelo de carcinoma de célula escamosa, lo que sensibiliza las células al tratamiento con cisplatino. Estos resultados indican que una regulación positiva o negativa de las variantes de *p73* por 1,25(OH)₂D₃ podría ser específica de tumor y/o variar dependiendo del contexto celular. Es de esperar que una proteína supresora tumoral como TAp73 debería ser regulada positivamente por 1,25(OH)₂D₃. Datos recientes sugieren que *TAp73* podría actuar como un dominante negativo sobre p53 (Novak, Grob et al. 2001; Freebern, Smith et al. 2003) y, como las formas $\Delta Np73$, mostrar propiedades oncogénicas. Es llamativo el hecho de que en las células MDA-MB-453 la disminución de *TAp73* tras tratamiento con 1,25(OH)₂D₃ sea menor que la de $\Delta Np73$ (Figura 13). Además, en las líneas celulares H1299 y 293T, la inducción de *TAp73* tras la expresión ectópica de survivina es mucho mayor que las de otras variantes de *p73* (Figura 14); posiblemente, deben existir diferentes mecanismos en las células para favorecer el ratio *TAp73*/ $\Delta Np73$ en favor de las isoformas *TAp73*.

Igualmente, es posible que si las propiedades supresoras tumorales de *TAp73* son parcialmente neutralizadas por la exposición a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, *p53* pueda llevar a cabo las funciones de supresor tumoral de *TAp73*. Sería interesante llevar a cabo ensayos clínicos en pacientes con cáncer con el fin de evaluar si los niveles de expresión de las variantes de *p73* disminuyen después del tratamiento con análogos no hipercalcémicos de vitamina D, mejorando la supervivencia de los pacientes. Finalmente, los niveles de expresión de *p73* podrían ser usados en el ámbito clínico, como un marcador para detectar a esos pacientes elegibles para la terapia con análogos de vitamina D, solo o en combinación con otros posibles marcadores ya descritos como VDR, coactivadores o corepresores de VDR o las enzimas implicadas en el metabolismo de la vitamina D, CYP24 y CYP27B1.

En nuestra serie de pacientes con cáncer de colon, hemos encontrado correlaciones positivas significativas entre los niveles de *TAp73*, $\Delta Np73$ y $\Delta Ex2p73$ y la expresión de *survivina*, lo que indica que *survivina* podría regular positivamente la expresión de las variantes de *p73 in vivo*, reproduciendo así el escenario *in vitro*. Sin embargo, este hallazgo no ha sido observado en el conjunto de pacientes con cáncer de mama. Puede ser que en la tumorigénesis de mama el contexto *in vivo* e *in vitro* no se correlacionen o que nuestra serie no sea lo suficientemente grande para mostrar tal asociación estadística. Igualmente, la correlación estadística inversa observada entre $\Delta Ex2p73$ y $\Delta Np73$ y VDR en la serie de cáncer de colon no se ha encontrado en los pacientes con cáncer de mama. En los pacientes con cáncer de colon, los niveles de VDR podrían reflejar la eficacia de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en la regulación de la expresión de las isoformas de *p73*, y por lo tanto, la disminución de VDR podría evitar la represión de las isoformas de *p73* por $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, y viceversa.

Yamamoto et al, observaron que la inducción *in vitro* de *EPR-1* en células de cáncer de colon se asociaba a una disminución de *survivina*, acompañada con una reducción similar en la proliferación celular y un aumento en la apoptosis y en la sensibilidad a agentes anticancerígenos (Yamamoto, Manome et al. 2002). En nuestra serie de cáncer de colon y mama, observamos una estrecha correlación entre los transcritos de *survivina* y *EPR-1*, similares a observaciones previas en neoplasias hematológicas (Shinozawa, Inokuchi et al. 2000; Oto, Paydas et al. 2007). Experimentos adicionales nos mostraron una expresión inversa de los transcritos de *EPR-1* y la proteína *survivina* en el 61,5% de los casos analizados. En total, nuestros resultados apoyan la posible función de *EPR-1* como un antisentido natural de *survivina*.

en un importante porcentaje de muestras de cáncer. Estas observaciones resaltan la importancia de encontrar estrategias para inducir la transcripción del *EPR-I* en la clínica con el fin de disminuir los niveles incrementados de *survivina* observados en la gran mayoría de los pacientes con cáncer.

Esta bien documentada la asociación de los niveles elevados de *survivina* con un peor pronóstico de los pacientes con cáncer (Kawasaki, Altieri et al. 1998; Lu, Altieri et al. 1998; Hinnis, Luckett et al. 2007; Altieri 2008; Nouraei, Mowla et al. 2009). Esperábamos que *survivina* se sobreexpresara en estadios avanzados, pero llamativamente, en nuestra serie de carcinomas de colon los niveles de *survivina* eran más altos en el estadio II que en el resto de estadios. No encontramos una explicación razonable para este hecho. Otros grupos no han observado una correlación entre los niveles de expresión de *survivina* y el estadio clínico en pacientes con cáncer de colon (Abd El-Hameed 2005). Si se ha descrito que aquellos pacientes en estadio II y positivos para *survivina* muestran menor supervivencia que aquellos pacientes con expresión negativa, así, y en la línea de los resultados que hemos observado, *survivina* podría ser utilizada para identificar aquellos pacientes con peor pronóstico en este grupo (Sarela, Scott et al. 2001). En nuestra serie de cáncer de mama, la sobreexpresión de *survivina* se asoció con dos parámetros de mal pronóstico, como receptores negativos de progesterona y expresión positiva de c-erbB2, asociaciones previamente descritas por otros grupos (Ryan, Konecny et al. 2006; Span, Tjan-Heijnen et al. 2006).

El significado pronóstico de *EPR-I* ha sido poco estudiado en tumores sólidos. En general, la disminución de *EPR-I* se asocia a un peor pronóstico de los pacientes tumorales (Yao, Liu et al. 2004; Oto, Paydas et al. 2007). En nuestra serie de cáncer de colon, aquellos pacientes cuya edad al diagnóstico era menor de 50 años mostraban niveles menores de *EPR-I*. Esto podría asociarse con el hecho de que los pacientes jóvenes con cáncer de colon muestran una enfermedad más agresiva. Adicionalmente, los pacientes en estadios avanzados mostraron niveles más bajos de *EPR-I*, así, los niveles de *EPR-I* podrían ser un marcador del potencial maligno en este tipo de tumor. Aunque la observación de que los niveles de *EPR-I* se asocien inversamente con la expresión de receptores de estrógeno y progesterona en los pacientes con cáncer de mama es inesperada, *EPR-I* podría ser usado como un marcador para la idoneidad de la paciente a la terapia hormonal.

En conclusión, 1,25(OH)₂D₃ regula negativamente a *survivina* y a las isoformas de *p73* en células de tumores de colon y mama. Las aproximaciones *in vitro* e *in vivo*

indican que *survivina* regula positivamente a las isoformas de *p73*, lo que refuerza nuestra hipótesis inicial de que la regulación negativa de las formas de *p73* por $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ podría ser dependiente de *survivina*. Por consiguiente, los niveles de expresión de las variantes de *p73* podrían utilizarse en la clínica para identificar candidatos para la terapia con análogos de vitamina D. Además, nuestros datos apoyan a *EPR-1* como un posible anti-sentido natural de *survivina* y como un marcador de malignidad, ya que sus niveles se asocian en pacientes con cáncer de colon y de mama con parámetros clásicamente asociados a peor pronóstico.

Finalmente, hay que resaltar que no se ha descrito que *survivina* pueda tener una función como factor de transcripción, pero curiosamente se ha observado en *C. elegans* que la proteína BIR-1, homóloga de *survivina*, puede participar en la regulación de la transcripción de ciertos genes a través de la modificación de los patrones de acetilación de histonas (Kostrouchova, Kostrouch et al. 2003). El hecho ya debatido por Wang et al, de que *survivina* module las isoformas de *p73* a nivel transcripcional en células humanas podría ser debido a posibles eventos epigenéticos subyacentes a este hecho (Wang, Fukuda et al. 2004). Basándonos en nuestros resultados y en los descritos para *C. Elegans*, nosotros hemos evaluado si en células tumorales humanas la proteína *survivina* podría modificar los niveles de las distintas isoformas de *p73* a través de distintos cambios en los patrones epigenéticos. Los resultados obtenidos indican que la expresión ectópica de *survivina* en líneas celulares tumorales de colon y mama, se traduce en una modificación de algunas marcas epigenéticas de histonas asociadas con un aumento de la transcripción en humanos (trimetilación de lisina 4 de la histona 3, H3K4me3, y acetilación de la lisina 16 de la histona 4, H4K16ac). Las modificaciones en el primer promotor de *p73* son muy consistentes, al contrario que las encontradas para el promotor 2, debido, probablemente, al bajo número de modificaciones epigenéticas que se tienen lugar ya en estado basal. Aunque podríamos hablar de cambios en los patrones de acetilación en este promotor, son necesarios estudios complementarios para confirmarlo. Los resultados obtenidos son muy significativos y novedosos, siendo la primera vez que se describe que *survivina* podría mediar efectos a nivel epigenéticos en humanos.

4. IMPLICACIÓN DE LAS ISOFORMAS DE *p73* EN PROCESOS DE QUÍMIO-RESISTENCIA

A pesar de que varios estudios, incluido el que aquí se presenta, han vinculado la sobreexpresión de isoformas específicas de *p73* con parámetros tumorales de peor pronóstico, existe poca información acerca de su impacto en la supervivencia de los pacientes. La sobreexpresión de la variante $\Delta Np73$ se asocia con una menor supervivencia en pacientes con neuroblastoma (Casciano, Mazzocco et al. 2002), meduloblastomas (Zitterbart, Zavrelova et al. 2007) y carcinoma de pulmón (Uramoto, Sugio et al. 2004), hepatocelular (Muller, Schilling et al. 2005) y cervical de células escamosas (Liu, Chan et al. 2006). Además, la sobreexpresión de la isoforma $\Delta Ex2/3p73$ se asocia con la supervivencia de los pacientes con glioma de bajo grado (Wager, Guilhot et al. 2006). En nuestra serie de pacientes con cáncer de colon, observamos que la sobreexpresión de las formas $\Delta Ex2/3p73$ y $\Delta Np73$ predicen supervivencia global, aunque en el análisis multivariante sólo el estadio patológico se mantiene como un predictor independiente. Dos artículos han descrito la sobreexpresión de *p73* como un marcador independiente de supervivencia en pacientes con cáncer de colon (Sun 2002; Toumi, El Hadj Oel et al. 2010). Estas publicaciones analizaron los niveles generales de *p73* sin tener en cuenta las diferentes isoformas que podrían estar implicadas realmente en el acortamiento de la supervivencia. Aunque los niveles generales de *p73* podrían utilizarse en el ámbito clínico como un predictor de supervivencia, hay un creciente interés en identificar qué isoformas específicas de *p73* realmente sustentan la función oncogénica en los procesos tumorales en humanos. Nuestros resultados apuntan a $\Delta Ex2/3p73$ y $\Delta Np73$ como las variantes que pueden llevar a cabo estas propiedades oncogénicas.

La asociación de la sobreexpresión de isoformas $\Delta TAp73$ con una supervivencia más corta podría ser debida a la transactivación de genes diana implicados en resistencia a drogas, angiogénesis, invasividad y otras etapas del proceso carcinogénico. *MDR1*, *HMGI* y *caspasa-1*, entre otros, han sido descritos como dianas de *p73 in vitro* (Uramoto, Izumi et al. 2003; Jain, Gupta et al. 2005; Johnson, Shepard et al. 2005; Vilgelm, Wei et al. 2008). En nuestro estudio, hemos encontrado una correlación directa estadísticamente significativa entre los niveles de expresión de $\Delta Ex2p73$, $\Delta Ex2/3p73$ y $\Delta Np73$ y los niveles de *HMGI*. Además, observamos una tendencia directa entre estas mismas isoformas y los niveles de expresión de *MDR1*. Esta asociación puede no

alcanzar la significación estadística debido al tamaño muestral. Nuestros resultados apoyan la posible regulación positiva de *HMGI* y *MDR1* por las formas $\Delta TAp73$ *in vivo* en carcinomas de colon. Aunque *TAp73* ha sido descrito como un regulador positivo de la expresión de la *caspasa-1*, tal correlación no fue observada en nuestra serie de pacientes (Jain, Gupta et al. 2005).

Además, la sobreexpresión de *MDR1* y *HMGI* se asoció con una SG más corta de los pacientes. En el análisis multivariante que incluyó los parámetros clínico-patológicos de los tumores y los niveles de expresión de las isoformas de *p73*, *MDR1*, *HMGI* y *caspasa-1*, observamos que, las expresiones de *MDR1* y *HMGI* predecían de manera independiente la SG de los pacientes, con un poder estadístico tan potente como el estadio tumoral. Estos datos ponen de manifiesto la importancia de identificar los efectores de las isoformas de $\Delta TAp73$, que podrían llevar a cabo sus funciones oncogénicas y predecir más estrechamente el pronóstico de los pacientes que las propias variantes de *p73* y, como tal, utilizarse en el ámbito clínico como marcadores de la evolución de los pacientes.

Se están acumulando cada vez más datos en la literatura que apoyan el papel oncogénico de las isoformas $\Delta TAp73$ (Schuster, Schilling et al. 2010; Wilhelm, Rufini et al. 2010), en este sentido, hay un creciente interés en la comunidad científica por identificar los mecanismos y las dianas que subyacen a estas funciones. Aquí, presentamos datos originales acerca del impacto de variantes específicas de *p73* en la evolución de los pacientes con cáncer de colon. Además, describimos como posibles dianas de las isoformas $\Delta TAp73$ son marcadores independientes de la SG. Específicamente, la sobreexpresión de *MDR1* y *HMGI* predicen independientemente la SG de los pacientes diagnosticados con cáncer de colon. Actualmente nuestro laboratorio está interesado en la identificación de las dianas específicas de las isoformas $\Delta TAp73$ que puedan llevar a cabo su función oncogénica y por tanto utilizarse en la clínica como marcadores de la evolución de los pacientes tumorales.

CONCLUSIONES

1. La sobreexpresión de las isoformas de *p73* en los carcinomas de colon y de mama, y su asociación con parámetros de peor pronóstico de los tumores y con la supervivencia global de los pacientes, indican su participación en el proceso carcinogénico y su posible valor predictivo en la evolución de los enfermos.

2. La correlación entre *p53* nativo y la sobreexpresión de las isoformas de *p73* apoya la contribución de ambas proteínas en la regulación de las mismas vías en un porcentaje significativo de los carcinomas.

3. La falta de correlación entre la sobreexpresión de la isoforma $\Delta Np73$ y *K-ras* oncogénico indica que, al contrario de lo que ocurre en distintos contextos *in vitro*, ambos no cooperan en la transformación celular *in vivo*.

4. La ausencia de correlación entre $\Delta Np73$ y *E2F1* puede deberse a que este último no regule la transcripción a partir del segundo promotor de *p73*. Las asociaciones directas entre *E2F1* y el resto de variantes de *p73* sugieren que el primer promotor de *p73* es una diana de este factor de transcripción.

5. Las asociaciones entre los niveles de las isoformas de *p73* y *VEGF*, *VEGF_{165b}* y *PEDF* sugieren que las primeras podrían modular la expresión de estos factores relacionados con el proceso angiogénico.

6. La asociación directa entre *VEGF* y *E2F-1* indica que VEGF podría inducir la expresión de E2F-1, y/o viceversa. Este hecho haría converger las vías de señalización de proliferación celular con las angiogénicas.

7. Eventos oncogénicos como mutaciones en *K-ras* y *p53* podrían afectar a los niveles de *PEDF* y *VEGF_{165b}*, respectivamente, modulando la angiogénesis tumoral.

8. La asociación de los niveles bajos de *VEGF_{165b}* con estadios tumorales avanzados, afectación ganglionar e invasión vascular apoya su papel como supresor tumoral y su posible utilidad en la predicción del pronóstico de los enfermos con cáncer de colon.

9. El tratamiento *in vitro* de líneas de cáncer de colon y mama con la forma activa de la vitamina D, 1,25(OH)₂D₃, se traduce en una disminución en los niveles de survivina y de las isoformas de *p73* tanto a nivel de proteína como a nivel de mensajero.

10. La expresión ectópica de survivina en distintas líneas celulares tumorales, se asocia a un aumento en los niveles de todas las isoformas de *p73*. Este hallazgo apoya que la regulación negativa de las isoformas de *p73* por 1,25(OH)₂D₃ pueda ser dependiente de survivina.

11. El aumento de los niveles de las isoformas de *p73* inducido por la expresión exógena de survivina es debido a cambios epigenéticos inducidos por esta última.

12. *EPR-1* podría actuar como un posible anti-sentido de *survivina*. Esto, junto a la observación de que los niveles de *EPR-1* se asocian a parámetros patológicos de peor pronóstico, sugiere su posible papel como indicador de malignidad de un tumor.

13. La correlación positiva entre los niveles de las isoformas $\Delta TAp73$ y la expresión de *HMGI* y *MDR1* indica que estos últimos podrían ser dianas transcripcionales de las primeras *in vivo*. Además, *MDR1* y *HMGI* predicen de forma potente e independiente la SG de los pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

- Abd El-Hameed, A. (2005). "Survivin expression in colorectal adenocarcinoma using tissue microarray." J Egypt Natl Canc Inst **17**(1): 42-50.
- Adida, C., P. L. Crotty, et al. (1998). "Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation." Am J Pathol **152**(1): 43-49.
- Aguilera, O., C. Pena, et al. (2007). "The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is induced by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 associated to the differentiation of human colon cancer cells." Carcinogenesis **28**(9): 1877-1884.
- Altieri, D. C. (2003). "Validating survivin as a cancer therapeutic target." Nat Rev Cancer **3**(1): 46-54.
- Altieri, D. C. (2006). "The case for survivin as a regulator of microtubule dynamics and cell-death decisions." Curr Opin Cell Biol **18**(6): 609-615.
- Altieri, D. C. (2008). "New wirings in the survivin networks." Oncogene **27**(48): 6276-6284.
- Andersen, T. I. (1996). "Genetic heterogeneity in breast cancer susceptibility." Acta Oncol **35**(4): 407-410.
- Arrowsmith, C. H. (1999). "Structure and function in the p53 family." Cell Death Differ **6**(12): 1169-1173.
- Arsham, A. M., D. R. Plas, et al. (2002). "Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling is neither required for hypoxic stabilization of HIF-1 α nor sufficient for HIF-1-dependent target gene transcription." J Biol Chem **277**(17): 15162-15170.
- Banerjee, P. and M. Chatterjee (2003). "Antiproliferative role of vitamin D and its analogs--a brief overview." Mol Cell Biochem **253**(1-2): 247-254.
- Bates, D. O., T. G. Cui, et al. (2002). "VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma." Cancer Res **62**(14): 4123-4131.
- Beck, W. T. (1987). "The cell biology of multiple drug resistance." Biochem Pharmacol **36**(18): 2879-2887.
- Becker, K., P. Pancoska, et al. (2006). "Patterns of p73 N-terminal isoform expression and p53 status have prognostic value in gynecological cancers." Int J Oncol **29**(4): 889-902.
- Beitzinger, M., L. Hofmann, et al. (2008). "p73 poses a barrier to malignant transformation by limiting anchorage-independent growth." EMBO J **27**(5): 792-803.
- Boonyaratanakornkit, V., V. Melvin, et al. (1998). "High-mobility group chromatin proteins 1 and 2 functionally interact with steroid hormone receptors to enhance their DNA binding in vitro and transcriptional activity in mammalian cells." Mol Cell Biol **18**(8): 4471-4487.

- Cai, Y. C., G. Y. Yang, et al. (2000). "Molecular alterations of p73 in human esophageal squamous cell carcinomas: loss of heterozygosity occurs frequently; loss of imprinting and elevation of p73 expression may be related to defective p53." Carcinogenesis **21**(4): 683-689.
- Campbell, M. J., A. F. Gombart, et al. (2000). "The anti-proliferative effects of 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ on breast and prostate cancer cells are associated with induction of BRCA1 gene expression." Oncogene **19**(44): 5091-5097.
- Carson, D. J., I. M. Santoro, et al. (2004). "Isoforms of the APC tumor suppressor and their ability to inhibit cell growth and tumorigenicity." Oncogene **23**(42): 7144-7148.
- Casciano, I., K. Mazzocco, et al. (2002). "Expression of DeltaNp73 is a molecular marker for adverse outcome in neuroblastoma patients." Cell Death Differ **9**(3): 246-251.
- Cohen AM, M. B., Schilsky RL (1997). Cancer Principles and Practice of Oncology. Cancer of the colon. H. S. Devitra Jr VT, Roosenberg SA. Philadelphia, PA, Lippincott-Raven: 1144-1197.
- Concin, N., K. Becker, et al. (2004). "Transdominant DeltaTAp73 isoforms are frequently up-regulated in ovarian cancer. Evidence for their role as epigenetic p53 inhibitors in vivo." Cancer Res **64**(7): 2449-2460.
- Concin, N., G. Hofstetter, et al. (2005). "Clinical relevance of dominant-negative p73 isoforms for responsiveness to chemotherapy and survival in ovarian cancer: evidence for a crucial p53-p73 cross-talk in vivo." Clin Cancer Res **11**(23): 8372-8383.
- Crane, C. H., L. M. Ellis, et al. (2006). "Phase I trial evaluating the safety of bevacizumab with concurrent radiotherapy and capecitabine in locally advanced pancreatic cancer." J Clin Oncol **24**(7): 1145-1151.
- Crawford, S. E., V. Stellmach, et al. (2001). "Pigment epithelium-derived factor (PEDF) in neuroblastoma: a multifunctional mediator of Schwann cell antitumor activity." J Cell Sci **114**(Pt 24): 4421-4428.
- Crook, T., S. Crossland, et al. (1997). "p53 mutations in BRCA1-associated familial breast cancer." Lancet **350**(9078): 638-639.
- Chaves, P., C. Cruz, et al. (2000). "Immunohistochemical detection of mismatch repair gene proteins as a useful tool for the identification of colorectal carcinoma with the mutator phenotype." J Pathol **191**(4): 355-360.
- Chi, S. G., S. G. Chang, et al. (1999). "Elevated and biallelic expression of p73 is associated with progression of human bladder cancer." Cancer Res **59**(12): 2791-2793.
- Chin, K. V., K. Ueda, et al. (1992). "Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53." Science **255**(5043): 459-462.
- Dalhoff, K., J. Dancey, et al. (2003). "A phase II study of the vitamin D analogue Seocalcitol in patients with inoperable hepatocellular carcinoma." Br J Cancer **89**(2): 252-257.

- Dawson, D. W., O. V. Volpert, et al. (1999). "Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis." Science **285**(5425): 245-248.
- Deeb, K. K., D. L. Trump, et al. (2007). "Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics." Nat Rev Cancer **7**(9): 684-700.
- Demay, M. B. (2006). "Mechanism of vitamin D receptor action." Ann N Y Acad Sci **1068**: 204-213.
- Doll, J. A., V. M. Stellmach, et al. (2003). "Pigment epithelium-derived factor regulates the vasculature and mass of the prostate and pancreas." Nat Med **9**(6): 774-780.
- Dominguez, G., C. Pena, et al. (2006). "The presence of an intronic deletion in p73 and high levels of ZEB1 alter the TAp73/DeltaTAp73 ratio in colorectal carcinomas." J Pathol **210**(4): 390-397.
- Dominguez, G., J. Silva, et al. (2001a). "Different expression of P14ARF defines two groups of breast carcinomas in terms of TP73 expression and TP53 mutational status." Genes Chromosomes Cancer **31**(2): 99-106.
- Dominguez, G., J. M. Silva, et al. (2001b). "Wild type p73 overexpression and high-grade malignancy in breast cancer." Breast Cancer Res Treat **66**(3): 183-190.
- Donehower, L. A., M. Harvey, et al. (1992). "Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours." Nature **356**(6366): 215-221.
- Feng, Q., P. Li, et al. (2005). "Caspase-1alpha is down-regulated in human ovarian cancer cells and the overexpression of caspase-1alpha induces apoptosis." Cancer Res **65**(19): 8591-8596.
- Ferrara, N. and T. Davis-Smyth (1997). "The biology of vascular endothelial growth factor." Endocr Rev **18**(1): 4-25.
- Ferrara, N., J. Winer, et al. (1993). "Expression of vascular endothelial growth factor does not promote transformation but confers a growth advantage in vivo to Chinese hamster ovary cells." J Clin Invest **91**(1): 160-170.
- Folkman, J. (1972). "Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors." Ann Surg **175**(3): 409-416.
- Fontemaggi, G., A. Gurtner, et al. (2001). "The transcriptional repressor ZEB regulates p73 expression at the crossroad between proliferation and differentiation." Mol Cell Biol **21**(24): 8461-8470.
- Fontemaggi, G., I. Kela, et al. (2002). "Identification of direct p73 target genes combining DNA microarray and chromatin immunoprecipitation analyses." J Biol Chem **277**(45): 43359-43368.
- Freebern, W. J., J. L. Smith, et al. (2003). "Novel cell-specific and dominant negative anti-apoptotic roles of p73 in transformed leukemia cells." J Biol Chem **278**(4): 2249-2255.

- Fuchs, C. S., E. L. Giovannucci, et al. (1994). "A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer." N Engl J Med **331**(25): 1669-1674.
- Fukuda, S. and L. M. Pelus (2006). "Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues." Mol Cancer Ther **5**(5): 1087-1098.
- Garcia, M., N. I. Fernandez-Garcia, et al. (2004). "Inhibition of xenografted human melanoma growth and prevention of metastasis development by dual antiangiogenic/antitumor activities of pigment epithelium-derived factor." Cancer Res **64**(16): 5632-5642.
- Gasparini, G. (2001). "Clinical significance of determination of surrogate markers of angiogenesis in breast cancer." Crit Rev Oncol Hematol **37**(2): 97-114.
- Gerber, H. P., A. McMurtrey, et al. (1998). "Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation." J Biol Chem **273**(46): 30336-30343.
- Gombart, A. F., Q. T. Luong, et al. (2006). "Vitamin D compounds: activity against microbes and cancer." Anticancer Res **26**(4A): 2531-2542.
- Grob, T. J., U. Novak, et al. (2001). "Human delta Np73 regulates a dominant negative feedback loop for TAp73 and p53." Cell Death Differ **8**(12): 1213-1223.
- Gruber, S. B., G. M. Petersen, et al. (1999). "Cancer, crash sites, and the new genetics of neoplasia." Gastroenterology **116**(1): 210-212.
- Guan, M., H. X. Peng, et al. (2003). "p73 Overexpression and angiogenesis in human colorectal carcinoma." Jpn J Clin Oncol **33**(5): 215-220.
- Guan, M., H. F. Yam, et al. (2003). "Loss of pigment epithelium derived factor expression in glioma progression." J Clin Pathol **56**(4): 277-282.
- Gupta, S., V. Radha, et al. (2001). "Direct transcriptional activation of human caspase-1 by tumor suppressor p53." J Biol Chem **276**(14): 10585-10588.
- Hanahan, D. and J. Folkman (1996). "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis." Cell **86**(3): 353-364.
- Hansen, C. M., L. Binderup, et al. (2001). "Vitamin D and cancer: effects of 1,25(OH)2D3 and its analogs on growth control and tumorigenesis." Front Biosci **6**: D820-848.
- Harms, K., S. Nozell, et al. (2004). "The common and distinct target genes of the p53 family transcription factors." Cell Mol Life Sci **61**(7-8): 822-842.
- Hartmann, A., H. Blaszyk, et al. (1997). "The molecular epidemiology of p53 gene mutations in human breast cancer." Trends Genet **13**(1): 27-33.

Hawker, N. P., S. D. Pennypacker, et al. (2007). "Regulation of human epidermal keratinocyte differentiation by the vitamin D receptor and its coactivators DRIP205, SRC2, and SRC3." J Invest Dermatol **127**(4): 874-880.

He, Q., C. H. Liang, et al. (2000). "Steroid hormones induce HMG1 overexpression and sensitize breast cancer cells to cisplatin and carboplatin." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(11): 5768-5772.

Hinnis, A. R., J. C. Lockett, et al. (2007). "Survivin is an independent predictor of short-term survival in poor prognostic breast cancer patients." Br J Cancer **96**(4): 639-645.

Houck, K. A., N. Ferrara, et al. (1991). "The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA." Mol Endocrinol **5**(12): 1806-1814.

<http://www.who.int/cancer/en>, World health organization (WHO).

Hurwitz, H., L. Fehrenbacher, et al. (2004). "Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer." N Engl J Med **350**(23): 2335-2342.

Imamura, T., H. Izumi, et al. (2001). "Interaction with p53 enhances binding of cisplatin-modified DNA by high mobility group 1 protein." J Biol Chem **276**(10): 7534-7540.

Jain, N., S. Gupta, et al. (2005). "Role of p73 in regulating human caspase-1 gene transcription induced by interferon- γ and cisplatin." J Biol Chem **280**(44): 36664-36673.

Jarry, A., G. Vallette, et al. (1999). "Interleukin 1 and interleukin 1 β converting enzyme (caspase 1) expression in the human colonic epithelial barrier. Caspase 1 downregulation in colon cancer." Gut **45**(2): 246-251.

Javelaud, D. and F. Besancon (2002). "Inactivation of p21WAF1 sensitizes cells to apoptosis via an increase of both p14ARF and p53 levels and an alteration of the Bax/Bcl-2 ratio." J Biol Chem **277**(40): 37949-37954.

Jayaraman, L., N. C. Moorthy, et al. (1998). "High mobility group protein-1 (HMG-1) is a unique activator of p53." Genes Dev **12**(4): 462-472.

Jee, C. D., H. S. Lee, et al. (2005). "Loss of caspase-1 gene expression in human gastric carcinomas and cell lines." Int J Oncol **26**(5): 1265-1271.

Jingjing, L., Y. Xue, et al. (1999). "Human Muller cells express VEGF183, a novel spliced variant of vascular endothelial growth factor." Invest Ophthalmol Vis Sci **40**(3): 752-759.

Johnson, R. A., E. M. Shepard, et al. (2005). "Differential regulation of MDR1 transcription by the p53 family members. Role of the DNA binding domain." J Biol Chem **280**(14): 13213-13219.

Jones, A., C. Fujiyama, et al. (2001). "Relation of vascular endothelial growth factor production to expression and regulation of hypoxia-inducible factor-1 α and

hypoxia-inducible factor-2 alpha in human bladder tumors and cell lines." Clin Cancer Res **7**(5): 1263-1272.

Kartasheva, N. N., A. Contente, et al. (2002). "p53 induces the expression of its antagonist p73 Delta N, establishing an autoregulatory feedback loop." Oncogene **21**(31): 4715-4727.

Kartasheva, N. N., C. Lenz-Bauer, et al. (2003). "DeltaNp73 can modulate the expression of various genes in a p53-independent fashion." Oncogene **22**(51): 8246-8254.

Kawasaki, H., D. C. Altieri, et al. (1998). "Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer." Cancer Res **58**(22): 5071-5074.

Kinzler, K. W., M. C. Nilbert, et al. (1991). "Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers." Science **251**(4999): 1366-1370.

Kinzler, K. W. and B. Vogelstein (1996). "Lessons from hereditary colorectal cancer." Cell **87**(2): 159-170.

Kirschner, L. S., L. M. Greenberger, et al. (1992). "Biochemical and genetic characterization of the multidrug resistance phenotype in murine macrophage-like J774.2 cells." Biochem Pharmacol **43**(1): 77-87.

Knudson, A. G. (1997). "Hereditary predisposition to cancer." Ann N Y Acad Sci **833**: 58-67.

Knudson, A. G., Jr. (1985). "Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes." Cancer Res **45**(4): 1437-1443.

Kommagani, R., V. Payal, et al. (2007). "Differential regulation of vitamin D receptor (VDR) by the p53 Family: p73-dependent induction of VDR upon DNA damage." J Biol Chem **282**(41): 29847-29854.

Kostrouchova, M., Z. Kostrouch, et al. (2003). "BIR-1, a Caenorhabditis elegans homologue of Survivin, regulates transcription and development." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(9): 5240-5245.

Kuida, K., J. A. Lippke, et al. (1995). "Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme." Science **267**(5206): 2000-2003.

Lamprecht, S. A. and M. Lipkin (2003). "Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: molecular mechanisms." Nat Rev Cancer **3**(8): 601-614.

Leach, F. S., N. C. Nicolaides, et al. (1993). "Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer." Cell **75**(6): 1215-1225.

Li, F., X. Ling, et al. (2005). "Differential regulation of survivin expression and apoptosis by vitamin D3 compounds in two isogenic MCF-7 breast cancer cell sublines." Oncogene **24**(8): 1385-1395.

- Li, F. P. and J. F. Fraumeni, Jr. (1969). "Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome?" Ann Intern Med **71**(4): 747-752.
- Li, P., H. Allen, et al. (1995). "Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock." Cell **80**(3): 401-411.
- Liaw, D., D. J. Marsh, et al. (1997). "Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome." Nat Genet **16**(1): 64-67.
- Lin, Y. L., S. Sengupta, et al. (2009). "p63 and p73 transcriptionally regulate genes involved in DNA repair." PLoS Genet **5**(10): e1000680.
- Liu, G., S. Nozell, et al. (2004). "DeltaNp73beta is active in transactivation and growth suppression." Mol Cell Biol **24**(2): 487-501.
- Liu, S. S., K. Y. Chan, et al. (2006). "Expression of deltaNp73 and TAp73alpha independently associated with radiosensitivities and prognoses in cervical squamous cell carcinoma." Clin Cancer Res **12**(13): 3922-3927.
- Lu, C. D., D. C. Altieri, et al. (1998). "Expression of a novel antiapoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas." Cancer Res **58**(9): 1808-1812.
- Lum, B. L., G. A. Fisher, et al. (1993). "Clinical trials of modulation of multidrug resistance. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations." Cancer **72**(11 Suppl): 3502-3514.
- Lynch, J. P. and T. C. Hoops (2002). "The genetic pathogenesis of colorectal cancer." Hematol Oncol Clin North Am **16**(4): 775-810.
- Ma, Y., W. D. Yu, et al. (2008). "1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 potentiates cisplatin antitumor activity by p73 induction in a squamous cell carcinoma model." Mol Cancer Ther **7**(9): 3047-3055.
- Maddika, S., S. R. Ande, et al. (2007). "Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy." Drug Resist Updat **10**(1-2): 13-29.
- Mantovani, F., S. Piazza, et al. (2004). "Pin1 links the activities of c-Abl and p300 in regulating p73 function." Mol Cell **14**(5): 625-636.
- Matsumoto, K., H. Ishikawa, et al. (2004). "Antiangiogenic property of pigment epithelium-derived factor in hepatocellular carcinoma." Hepatology **40**(1): 252-259.
- Mazure, N. M., E. Y. Chen, et al. (1997). "Induction of vascular endothelial growth factor by hypoxia is modulated by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in Ha-ras-transformed cells through a hypoxia inducible factor-1 transcriptional element." Blood **90**(9): 3322-3331.
- Melino, G., X. Lu, et al. (2003). "Functional regulation of p73 and p63: development and cancer." Trends Biochem Sci **28**(12): 663-670.

- Miyagishi, D., K. Ohno-Matsui, et al. (2003). "Regulation of the expression of pigment epithelium-derived factor, an anti-angiogenic factor in human oral squamous cell carcinoma cell lines." Cancer Lett **196**(1): 77-85.
- Miyaki, M., J. Nishio, et al. (1997). "Drastic genetic instability of tumors and normal tissues in Turcot syndrome." Oncogene **15**(23): 2877-2881.
- Mukhopadhyay, D., L. Tsiokas, et al. (1995). "Wild-type p53 and v-Src exert opposing influences on human vascular endothelial growth factor gene expression." Cancer Res **55**(24): 6161-6165.
- Muller, M., T. Schilling, et al. (2005). "TAp73/Delta Np73 influences apoptotic response, chemosensitivity and prognosis in hepatocellular carcinoma." Cell Death Differ **12**(12): 1564-1577.
- Muller, M., E. S. Schleithoff, et al. (2006). "One, two, three--p53, p63, p73 and chemosensitivity." Drug Resist Updat **9**(6): 288-306.
- Muñoz, A., Ed. (1997). Cáncer: genes y nuevas terapias. Madrid, Editorial Hérica.
- Nagatani, G., M. Nomoto, et al. (2001). "Transcriptional activation of the human HMG1 gene in cisplatin-resistant human cancer cells." Cancer Res **61**(4): 1592-1597.
- Nakagawa, T., M. Takahashi, et al. (2002). "Autoinhibitory regulation of p73 by Delta Np73 to modulate cell survival and death through a p73-specific target element within the Delta Np73 promoter." Mol Cell Biol **22**(8): 2575-2585.
- Nicolaides, N. C., N. Papadopoulos, et al. (1994). "Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer." Nature **371**(6492): 75-80.
- Nouraei, N., S. J. Mowla, et al. (2009). "Expression of survivin and its spliced variants in bladder tumors as a potential prognostic marker." Urol J **6**(2): 101-108.
- Novak, U., T. J. Grob, et al. (2001). "Overexpression of the p73 gene is a novel finding in high-risk B-cell chronic lymphocytic leukemia." Ann Oncol **12**(7): 981-986.
- Nyman, U., P. Vlachos, et al. (2009). "Protein kinase C-dependent phosphorylation regulates the cell cycle-inhibitory function of the p73 carboxy terminus transactivation domain." Mol Cell Biol **29**(7): 1814-1825.
- Oto, M., S. Miyake, et al. (1993). "Optimization of nonradioisotopic single strand conformation polymorphism analysis with a conventional minislab gel electrophoresis apparatus." Anal Biochem **213**(1): 19-22.
- Oto, O. A., S. Paydas, et al. (2007). "Survivin and EPR-1 expression in acute leukemias: prognostic significance and review of the literature." Leuk Res **31**(11): 1495-1501.
- Ou, H. D., F. Lohr, et al. (2007). "Structural evolution of C-terminal domains in the p53 family." EMBO J **26**(14): 3463-3473.

- Ozaki, T., M. Naka, et al. (1999). "Deletion of the COOH-terminal region of p73alpha enhances both its transactivation function and DNA-binding activity but inhibits induction of apoptosis in mammalian cells." Cancer Res **59**(23): 5902-5907.
- Palmer, H. G., J. M. Gonzalez-Sancho, et al. (2001). "Vitamin D(3) promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of beta-catenin signaling." J Cell Biol **154**(2): 369-387.
- Papadopoulos, N., N. C. Nicolaides, et al. (1994). "Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer." Science **263**(5153): 1625-1629.
- Paques, M., P. Massin, et al. (1997). "Growth factors and diabetic retinopathy." Diabetes Metab **23**(2): 125-130.
- Paradis, V., N. B. Lagha, et al. (2000). "Expression of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinomas." Virchows Arch **436**(4): 351-356.
- Pena, C., J. M. Garcia, et al. (2006). "The expression levels of the transcriptional regulators p300 and CtBP modulate the correlations between SNAIL, ZEB1, E-cadherin and vitamin D receptor in human colon carcinomas." Int J Cancer **119**(9): 2098-2104.
- Pena, C., J. M. Garcia, et al. (2005). "E-cadherin and vitamin D receptor regulation by SNAIL and ZEB1 in colon cancer: clinicopathological correlations." Hum Mol Genet **14**(22): 3361-3370.
- Perez, R. P., T. C. Hamilton, et al. (1993). "Mechanisms and modulation of resistance to chemotherapy in ovarian cancer." Cancer **71**(4 Suppl): 1571-1580.
- Petrenko, O., A. Zaika, et al. (2003). "deltaNp73 facilitates cell immortalization and cooperates with oncogenic Ras in cellular transformation in vivo." Mol Cell Biol **23**(16): 5540-5555.
- Phelan, C. M., T. R. Rebbeck, et al. (1996). "Ovarian cancer risk in BRCA1 carriers is modified by the HRAS1 variable number of tandem repeat (VNTR) locus." Nat Genet **12**(3): 309-311.
- Poltorak, Z., T. Cohen, et al. (1997). "VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix." J Biol Chem **272**(11): 7151-7158.
- Pritchard-Jones, R. O., D. B. Dunn, et al. (2007). "Expression of VEGF(xxx)b, the inhibitory isoforms of VEGF, in malignant melanoma." Br J Cancer **97**(2): 223-230.
- Putzer, B. M., S. Tuve, et al. (2003). "Increased DeltaN-p73 expression in tumors by upregulation of the E2F1-regulated, TA-promoter-derived DeltaN'-p73 transcript." Cell Death Differ **10**(5): 612-614.
- Quinn, M. J., A. d'Onofrio, et al. (2003). "Cancer mortality trends in the EU and acceding countries up to 2015." Ann Oncol **14**(7): 1148-1152.
- Rak, J., J. Filmus, et al. (1995). "Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis." Cancer Metastasis Rev **14**(4): 263-277.

- Rak, J., Y. Mitsunashi, et al. (1995). "Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis." Cancer Res **55**(20): 4575-4580.
- Rak, J., Y. Mitsunashi, et al. (2000). "Oncogenes and tumor angiogenesis: differential modes of vascular endothelial growth factor up-regulation in ras-transformed epithelial cells and fibroblasts." Cancer Res **60**(2): 490-498.
- Ryan, B. M., G. E. Konecny, et al. (2006). "Survivin expression in breast cancer predicts clinical outcome and is associated with HER2, VEGF, urokinase plasminogen activator and PAI-1." Ann Oncol **17**(4): 597-604.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, et al. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**(4839): 487-491.
- Salimath, B., D. Marme, et al. (2000). "Expression of the vascular endothelial growth factor gene is inhibited by p73." Oncogene **19**(31): 3470-3476.
- Salovaara, R., A. Loukola, et al. (2000). "Population-based molecular detection of hereditary nonpolyposis colorectal cancer." J Clin Oncol **18**(11): 2193-2200.
- Sampath, J. and L. M. Pelus (2007). "Alternative splice variants of survivin as potential targets in cancer." Curr Drug Discov Technol **4**(3): 174-191.
- Sarela, A. I., N. Scott, et al. (2001). "Immunohistochemical detection of the anti-apoptosis protein, survivin, predicts survival after curative resection of stage II colorectal carcinomas." Ann Surg Oncol **8**(4): 305-310.
- Sasaki, Y., Y. Naishiro, et al. (2005). "Identification of pigment epithelium-derived factor as a direct target of the p53 family member genes." Oncogene **24**(32): 5131-5136.
- Savitsky, K., A. Bar-Shira, et al. (1995). "A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase." Science **268**(5218): 1749-1753.
- Sayan, A. E., J. P. Roperch, et al. (2007). "Generation of DeltaTAp73 proteins by translation from a putative internal ribosome entry site." Ann N Y Acad Sci **1095**: 315-324.
- Schlichtholz, B., B. Bouchind'homme, et al. (1998). "p53 mutations in BRCA1-associated familial breast cancer." Lancet **352**(9128): 622.
- Schubert, E. L., M. K. Lee, et al. (1997). "BRCA2 in American families with four or more cases of breast or ovarian cancer: recurrent and novel mutations, variable expression, penetrance, and the possibility of families whose cancer is not attributable to BRCA1 or BRCA2." Am J Hum Genet **60**(5): 1031-1040.
- Schuster, A., T. Schilling, et al. (2010). "DeltaNp73beta is oncogenic in hepatocellular carcinoma by blocking apoptosis signaling via death receptors and mitochondria." Cell Cycle **9**(13).
- Seelan, R. S., M. Irwin, et al. (2002). "The human p73 promoter: characterization and identification of functional E2F binding sites." Neoplasia **4**(3): 195-203.

- Sharpe, C. R., J. Siemiatycki, et al. (2002). "Effects of alcohol consumption on the risk of colorectal cancer among men by anatomical subsite (Canada)." Cancer Causes Control **13**(5): 483-491.
- Shinozawa, I., K. Inokuchi, et al. (2000). "Disturbed expression of the anti-apoptosis gene, survivin, and EPR-1 in hematological malignancies." Leuk Res **24**(11): 965-970.
- Sjogren, S., M. Inganas, et al. (1996). "The p53 gene in breast cancer: prognostic value of complementary DNA sequencing versus immunohistochemistry." J Natl Cancer Inst **88**(3-4): 173-182.
- Span, P. N., V. C. Tjan-Heijnen, et al. (2006). "Do the survivin (BIRC5) splice variants modulate or add to the prognostic value of total survivin in breast cancer?" Clin Chem **52**(9): 1693-1700.
- Spirio, L., S. Olschwang, et al. (1993). "Alleles of the APC gene: an attenuated form of familial polyposis." Cell **75**(5): 951-957.
- Stiewe, T., J. Stanelle, et al. (2003). "Inactivation of retinoblastoma (RB) tumor suppressor by oncogenic isoforms of the p53 family member p73." J Biol Chem **278**(16): 14230-14236.
- Stiewe, T., C. C. Theseling, et al. (2002). "Transactivation-deficient Delta TA-p73 inhibits p53 by direct competition for DNA binding: implications for tumorigenesis." J Biol Chem **277**(16): 14177-14185.
- Stiewe, T., S. Tuve, et al. (2004). "Quantitative TP73 transcript analysis in hepatocellular carcinomas." Clin Cancer Res **10**(2): 626-633.
- Stiewe, T., S. Zimmermann, et al. (2002). "Transactivation-deficient DeltaTA-p73 acts as an oncogene." Cancer Res **62**(13): 3598-3602.
- Stratton, M. R. and R. Wooster (1996). "Hereditary predisposition to breast cancer." Curr Opin Genet Dev **6**(1): 93-97.
- Stros, M., T. Ozaki, et al. (2002). "HMGB1 and HMGB2 cell-specifically down-regulate the p53- and p73-dependent sequence-specific transactivation from the human Bax gene promoter." J Biol Chem **277**(9): 7157-7164.
- Sun, X. F. (2002). "p73 overexpression is a prognostic factor in patients with colorectal adenocarcinoma." Clin Cancer Res **8**(1): 165-170.
- Sunahara, M., S. Ichimiya, et al. (1998). "Mutational analysis of the p73 gene localized at chromosome 1p36.3 in colorectal carcinomas." Int J Oncol **13**(2): 319-323.
- Sunderkotter, C., K. Steinbrink, et al. (1994). "Macrophages and angiogenesis." J Leukoc Biol **55**(3): 410-422.
- Swift, M. (1994). "Ionizing radiation, breast cancer, and ataxia-telangiectasia." J Natl Cancer Inst **86**(21): 1571-1572.

- Takebayashi, Y., S. Aklyama, et al. (1996). "Angiogenesis as an unfavorable prognostic factor in human colorectal carcinoma." Cancer **78**(2): 226-231.
- Takenaka, K., S. Yamagishi, et al. (2005). "Pigment epithelium-derived factor (PEDF)-induced apoptosis and inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in MG63 human osteosarcoma cells." Life Sci **77**(25): 3231-3241.
- Tanaka, Y., M. Kameoka, et al. (2004). "Regulation of HSF1-responsive gene expression by N-terminal truncated form of p73alpha." Biochem Biophys Res Commun **317**(3): 865-872.
- Tannapfel, A., M. Wasner, et al. (1999). "Expression of p73 and its relation to histopathology and prognosis in hepatocellular carcinoma." J Natl Cancer Inst **91**(13): 1154-1158.
- Tissir, F., A. Ravni, et al. (2009). "DeltaNp73 regulates neuronal survival in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(39): 16871-16876.
- Tokunaga, T., Y. Oshika, et al. (1998). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA isoform expression pattern is correlated with liver metastasis and poor prognosis in colon cancer." Br J Cancer **77**(6): 998-1002.
- Tomasini, R., K. Tsuchihara, et al. (2008). "TAp73 knockout shows genomic instability with infertility and tumor suppressor functions." Genes Dev **22**(19): 2677-2691.
- Toumi, A. A., A. El Hadj Oel, et al. (2010). "The prognostic value of p73 overexpression in colorectal carcinoma: a clinicopathologic, immunohistochemical, and statistical study of 204 patients." Appl Immunohistochem Mol Morphol **18**(2): 128-136.
- Troisi, R. J., A. N. Freedman, et al. (1999). "Incidence of colorectal carcinoma in the U.S.: an update of trends by gender, race, age, subsite, and stage, 1975-1994." Cancer **85**(8): 1670-1676.
- Trump, D. L., P. A. Hershberger, et al. (2004). "Anti-tumor activity of calcitriol: pre-clinical and clinical studies." J Steroid Biochem Mol Biol **89-90**(1-5): 519-526.
- Uehara, H., M. Miyamoto, et al. (2004). "Expression of pigment epithelium-derived factor decreases liver metastasis and correlates with favorable prognosis for patients with ductal pancreatic adenocarcinoma." Cancer Res **64**(10): 3533-3537.
- Uramoto, H., H. Izumi, et al. (2003). "Physical interaction of tumour suppressor p53/p73 with CCAAT-binding transcription factor 2 (CTF2) and differential regulation of human high-mobility group 1 (HMG1) gene expression." Biochem J **371**(Pt 2): 301-310.
- Uramoto, H., K. Sugio, et al. (2004). "Expression of deltaNp73 predicts poor prognosis in lung cancer." Clin Cancer Res **10**(20): 6905-6911.
- Vandesompele, J., K. De Preter, et al. (2002). "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes." Genome Biol **3**(7): RESEARCH0034.

- Vermeulen, P. B., G. G. Van den Eynden, et al. (1999). "Prospective study of intratumoral microvessel density, p53 expression and survival in colorectal cancer." Br J Cancer **79**(2): 316-322.
- Vikhanskaya, F., M. R. Bani, et al. (2001). "p73 Overexpression increases VEGF and reduces thrombospondin-1 production: implications for tumor angiogenesis." Oncogene **20**(50): 7293-7300.
- Vilgelm, A., J. X. Wei, et al. (2008). "DeltaNp73alpha regulates MDR1 expression by inhibiting p53 function." Oncogene **27**(15): 2170-2176.
- Viloria-Petit, A., L. Miquerol, et al. (2003). "Contrasting effects of VEGF gene disruption in embryonic stem cell-derived versus oncogene-induced tumors." EMBO J **22**(16): 4091-4102.
- Vogelstein, B., D. Lane, et al. (2000). "Surfing the p53 network." Nature **408**(6810): 307-310.
- Wager, M., J. Guilhot, et al. (2006). "Prognostic value of increase in transcript levels of Tp73 DeltaEx2-3 isoforms in low-grade glioma patients." Br J Cancer **95**(8): 1062-1069.
- Wang, Z., S. Fukuda, et al. (2004). "Survivin regulates the p53 tumor suppressor gene family." Oncogene **23**(49): 8146-8153.
- Weinmann, A. S. and P. J. Farnham (2002). "Identification of unknown target genes of human transcription factors using chromatin immunoprecipitation." Methods **26**(1): 37-47.
- Wells, J. and P. J. Farnham (2002). "Characterizing transcription factor binding sites using formaldehyde crosslinking and immunoprecipitation." Methods **26**(1): 48-56.
- Whittle, C., K. Gillespie, et al. (1999). "Heterogeneous vascular endothelial growth factor (VEGF) isoform mRNA and receptor mRNA expression in human glomeruli, and the identification of VEGF148 mRNA, a novel truncated splice variant." Clin Sci (Lond) **97**(3): 303-312.
- Whyte, M. (1996). "ICE/CED-3 proteases in apoptosis." Trends Cell Biol **6**(7): 245-248.
- Wilhelm, M. T., A. Rufini, et al. (2010). "Isoform-specific p73 knockout mice reveal a novel role for {Delta}Np73 in the DNA damage response pathway." Genes Dev **24**(6): 549-560.
- Winawer, S. J., J. St John, et al. (1990). "Screening of average-risk individuals for colorectal cancer. WHO Collaborating Centre for the Prevention of Colorectal Cancer." Bull World Health Organ **68**(4): 505-513.
- Winter, R. N., A. Kramer, et al. (2001). "Loss of caspase-1 and caspase-3 protein expression in human prostate cancer." Cancer Res **61**(3): 1227-1232.

Woolard, J., W. Y. Wang, et al. (2004). "VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression." Cancer Res **64**(21): 7822-7835.

Wulf, G. M., Y. C. Liou, et al. (2002). "Role of Pin1 in the regulation of p53 stability and p21 transactivation, and cell cycle checkpoints in response to DNA damage." J Biol Chem **277**(50): 47976-47979.

www.cne.isciii.es La situación del cáncer en España. 1975-2006.

Yamamoto, T., Y. Manome, et al. (2002). "Downregulation of survivin expression by induction of the effector cell protease receptor-1 reduces tumor growth potential and results in an increased sensitivity to anticancer agents in human colon cancer." Eur J Cancer **38**(17): 2316-2324.

Yamashita, S., M. Chujo, et al. (2009). "Combination of p53AIP1 and survivin expression is a powerful prognostic marker in non-small cell lung cancer." J Exp Clin Cancer Res **28**: 22.

Yang, A., M. Kaghad, et al. (1998). "p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities." Mol Cell **2**(3): 305-316.

Yang, A., N. Walker, et al. (2000). "p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours." Nature **404**(6773): 99-103.

Yao, X. Q., F. K. Liu, et al. (2004). "Significance of effector protease receptor-1 expression and its relationship with proliferation and apoptotic index in patients with primary advanced gastric adenocarcinoma." World J Gastroenterol **10**(9): 1262-1267.

Yu, J., V. Baron, et al. (2007). "A network of p73, p53 and Egr1 is required for efficient apoptosis in tumor cells." Cell Death Differ **14**(3): 436-446.

Yu, Q. (2006). "Restoring p53-mediated apoptosis in cancer cells: new opportunities for cancer therapy." Drug Resist Updat **9**(1-2): 19-25.

Zacchi, P., M. Gostissa, et al. (2002). "The prolyl isomerase Pin1 reveals a mechanism to control p53 functions after genotoxic insults." Nature **419**(6909): 853-857.

Zaika, A. I., S. Kovalev, et al. (1999). "Overexpression of the wild type p73 gene in breast cancer tissues and cell lines." Cancer Res **59**(13): 3257-3263.

Zaika, A. I., N. Slade, et al. (2002). "DeltaNp73, a dominant-negative inhibitor of wild-type p53 and TAp73, is up-regulated in human tumors." J Exp Med **196**(6): 765-780.

Zhang, L., D. Yu, et al. (2000). "Wild-type p53 suppresses angiogenesis in human leiomyosarcoma and synovial sarcoma by transcriptional suppression of vascular endothelial growth factor expression." Cancer Res **60**(13): 3655-3661.

Zheng, H., H. You, et al. (2002). "The prolyl isomerase Pin1 is a regulator of p53 in genotoxic response." Nature **419**(6909): 849-853.

Zhu, Y., K. Jin, et al. (2003). "Vascular endothelial growth factor promotes proliferation of cortical neuron precursors by regulating E2F expression." FASEB J **17**(2): 186-193.

Zitterbart, K., I. Zavrelova, et al. (2007). "p73 expression in medulloblastoma: TAp73/DeltaNp73 transcript detection and possible association of p73alpha/DeltaNp73 immunoreactivity with survival." Acta Neuropathol **114**(6): 641-650.

ANEXO

p73 isoforms affect VEGF, VEGF_{165b} and PEDF expression in human colorectal tumors: VEGF_{165b} downregulation as a marker of poor prognosis

Raquel Díaz¹, Cristina Peña¹, Javier Silva¹, Yolanda Lorenzo¹, Vanesa García¹, José M. García¹, Antonio Sánchez¹, Pablo Espinosa¹, Rosario Yuste², Félix Bonilla¹ and Gemma Domínguez^{1*}

¹Department of Medical Oncology, Hospital Universitario Puerta de Hierro, 28035 Madrid, Spain

²Department of Pathology, Hospital Universitario Puerta de Hierro, 28035 Madrid, Spain

The secreted mitogen vascular endothelial growth factor, VEGF, plays a pivotal role in angiogenesis. Hypoxia, inactivation of p53 and oncogenic K-Ras induce VEGF expression. Other factors such as p73 may also affect VEGF levels. Curiously, p73 may also regulate angiogenesis by affecting the expression of the pigment epithelium-derived factor, PEDF. Additionally, VEGF might harbor additional functions through the activation of E2F transcription factors. Recently, a new VEGF variant formed by alternative splicing, VEGF_{165b}, has been described as exerting anti-angiogenic activity. We study here whether p73 isoforms levels -TAp73 and Δ TAp73- and p53 and K-Ras status affect the expression of the above-mentioned angiogenesis-related genes (through the correlation between their expressions), the prognostic value of VEGF_{165b} and PEDF and the correlation between VEGF and E2F-1 levels. Tumor and normal tissue of 112 colorectal cancer patients was analyzed to evaluate: (i) levels of TAp73, Δ TAp73, VEGF, VEGF_{165b}, PEDF and E2F-1 by quantitative real-time RT-PCR, (ii) p53 status by immunohistochemistry and (iii) mutations in the first exon of *K-Ras* by PCR-SSCP. Tumor characteristics were examined in each patient. Associations were observed between: (i) specific p73 isoforms and VEGF and VEGF_{165b} expression; (ii) Δ Ex2p73 variant and downregulation of PEDF; (iii) VEGF and PEDF expression; (iv) inactive p53 and VEGF_{165b} levels; (v) oncogenic *K-Ras* and PEDF downregulation; (vi) E2F-1 and VEGF expressions; (vii) VEGF_{165b} downregulation and poor prognosis parameters of tumors. We conclude that the levels of p73 isoforms could affect the expression of VEGF, VEGF_{165b} and PEDF. This scenario becomes complicated because a feedback between VEGF and PEDF may exist. VEGF may activate the E2F-1 factor. Mutations in *K-Ras* could negatively regulate PEDF expression. p53 inactivation might result in compensatory mechanisms such as over-expression of VEGF_{165b}. Our data support the role of VEGF_{165b} as a tumor suppressor factor in colorectal carcinogenesis and its possible prognosis value.

© 2008 Wiley-Liss, Inc.

Key words: p73 isoforms; angiogenesis; VEGF; VEGF_{165b} and PEDF

As tumors enlarge and hypoxia develops, the induction of new blood vessels becomes critical to sustaining neoplastic proliferation.¹ Angiogenesis depends on the local balance between positive and negative effectors, whose production can be regulated by oncogenes and tumor suppressor genes. The secreted mitogen, vascular endothelial growth factor A, VEGF-A (commonly referred to as VEGF), seems to play a pivotal and irreplaceable role in the regulation of physiological and pathological angiogenesis.² Various events stimulate VEGF expression, such as hypoxia.^{3–6} In addition, several specific transforming alterations may also induce VEGF expression, such as inactivating mutations of p53⁷ and oncogenic mutations of *K-Ras*.⁸ Interestingly, VEGF may promote proliferation by affecting the expression of E2F family transcription factors.⁹

An increase in VEGF mRNA expression has been identified in almost all known tumors.¹⁰ Specifically, VEGF is found over-expressed in both advanced colon cancers and pre-malignant colonic adenomas.¹¹ Positive correlation between tumor VEGF expression and tumor vascularity has been described, and in many studies a correlation with prognosis has been shown.^{12–16} Currently, different anti-VEGF therapies are being given¹⁷ and improved efficacy on metastatic colorectal cancer without increasing toxicity has been reported.¹⁸

Exon splicing of the VEGF pre-RNA results in multiple isoforms that show angiogenic properties (VEGF_{189,165,121,206,183,145,148}).^{10,19–22} although VEGF₁₆₅ appears to predominate quantitatively and functionally in most angiogenic states.²³ Recently, Bates *et al.*²⁴ identified VEGF_{165b}, a new variant formed by differential splicing from the end of exon 7 into the 3' untranslated region of the VEGF mRNA. VEGF_{165b} has been described as acting as an endogenous inhibitory form of VEGF and, therefore, has a putative anti-angiogenesis role.²³ Other VEGF_{xxx}b forms have been described, but the only one of these isoforms for which there is any functional information is VEGF_{165b}. Further experiments showed that VEGF_{165b} inhibited VEGF₁₆₅-induced angiogenesis in the rabbit cornea and the rat mesentery, and inhibited tumor growth in xenotransplanted tumors in mice.²³ VEGF_{165b} was found down-regulated in renal and prostate human cancers,^{23,24} and its absence has been recently described to predict metastatic spread in patients with primary melanoma.²⁵

Because of its essential role in cancer angiogenesis, and eventually in metastasis, there is growing interest in identifying additional tumor suppressor proteins and/or onco-proteins which may regulate VEGF mRNA and protein levels. Some controversial results regarding the putative role of the p53-related protein p73 in regulating VEGF expression have been published. While some of these data show the plausible involvement of p73 as a VEGF repressor,²⁶ other observations support its role as a VEGF inducer.^{27,28} The p73 gene gives rise to a complex number of isoforms with both tumor suppressor—TAp73—²⁹ and oncogenic properties— Δ TAp73.³⁰ As described for the other p53-family member, p63, TAp73 forms might repress the expression of VEGF while the Δ TAp73 forms might activate its transcription.³¹ This remains unclear.

Curiously, p73 seems to play a role in angiogenesis not only by possibly regulating the transcription of VEGF, but also by targeting other angiogenesis-related proteins such as the pigment epithelium-derived factor, PEDF.³² In cancer cells PEDF expression has been observed to be induced by p73.³² PEDF is a secreted glycoprotein expressed in many tissues^{33,34} and acts as a neurotrophic factor and a natural angiogenesis inhibitor in prostate, pancreas, eye, hepatocellular carcinoma cells and melanoma.^{33–37} Loss of PEDF could be involved in glioma progression³⁸ and in pancreatic adenocarcinoma, PEDF-positive expression was an independent favorable prognostic factor.³⁹ In VEGF/- adult fibroblast, it has been observed that Ras oncoprotein downregulates PEDF, giving rise to highly tumorigenic and angiogenic fibrosarcomas.⁴⁰ Interestingly, in osteosarcoma cells, PEDF inhibits VEGF expression at mRNA and protein levels,⁴¹ while, in oral squamous cell carcinoma cells, VEGF induced mRNA PEDF expression and its secretion.⁴²

Grant sponsors: FIS and SAF; Grant numbers: PI05/0657, 2004-01002.

*Correspondence to: Department of Medical Oncology, Hospital Universitario Puerta de Hierro, C/San Martín de Porres 4, 28035-Madrid, Spain. Fax: +34-91-3445190. E-mail: dominggg@hotmail.com

Received 5 June 2007; Accepted after revision 3 March 2008

DOI 10.1002/ijc.23619

Published online 10 June 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

Differential Regulation of TP73 Isoforms by $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ and Survivin in Human Colon and Breast Carcinomas

Raquel Díaz,¹ José M. González-Sancho,² Beatriz Soldevilla,¹ Javier Silva,¹ José M. García,¹ Vanesa García,¹ Cristina Peña,¹ Mercedes Herrera,¹ Irene Gómez,¹ Félix Bonilla,^{1*} and Gemma Domínguez^{1*}

¹Department of Medical Oncology, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

²Department of Cancer Biology, Instituto de Investigaciones Biomédicas 'Alberto Sols,' Madrid, Spain

We evaluate whether $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ downregulates TP73 variants in colon and breast carcinomas, the role of survivin in this context, and the significance of this network in the clinic. Tumor cells were treated/untreated with $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and transiently transfected with survivin. Levels of survivin and TP73 variants were evaluated by quantitative RT-PCR and Western blotting. In 75 colon and 60 breast cancer patients, the expressions of survivin and TP73 isoforms were determined. Tumor characteristics were examined in each patient. Survivin protein levels were also evaluated in a subgroup of patients and cell lines. Decrease in survivin and TAp73 transcripts and protein and $\Delta\text{Np}73$ mRNA was detected after $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ treatment. Ectopic survivin expression led to an increase in the TAp73, $\Delta\text{Np}73$, $\Delta\text{Ex}2\text{p}73$, and $\Delta\text{Ex}2\text{-}3\text{p}73$ transcripts. In cancer patients, direct correlations were observed between TP73 variants and survivin levels. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ negatively regulate survivin and TP73 variants in colon and breast cancer cells. Positive regulation of TP73 isoforms by survivin may exist, which reinforces the possibility that the downregulation of TP73 forms by $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ is survivin-dependent. © 2010 Wiley-Liss, Inc.

INTRODUCTION

The TP73 gene produces multiple transcripts with opposing functions. Full-length isoforms—TAp73—largely mimic TP53 activities (Jost et al., 1997). However, $\Delta\text{TAp}73$ variants ($\Delta\text{Ex}2\text{p}73$, $\Delta\text{Ex}2/3\text{p}73$, $\Delta\text{Np}73$, and $\Delta\text{N}^{\text{p}}73$) are transactivation-deficient and show oncogenic potential (Kaghad et al., 1997; Pozniak et al., 2000; Sherr and Weber, 2000; Fillipovich et al., 2001; Stiewe et al., 2002a,b, 2003; Zaika et al., 2002; Petrenko et al., 2003). Overexpression of TAp73 and $\Delta\text{TAp}73$ is described in several tumor types (Zaika et al., 2002; Concin et al., 2004; Stiewe et al., 2004; Tuve et al., 2004; Domínguez et al., 2006), and upregulation of the oncogenic forms is associated with poor prognosis (Uramoto et al., 2004; Müller et al., 2005; Becker et al., 2006; Domínguez et al., 2006; Liu et al., 2006; Wager et al., 2006). Thus, it would be important to identify pathways/compounds that negatively regulate the expression of $\Delta\text{TAp}73$ isoforms.

$1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) regulates genes involved in calcium homeostasis and bone formation through its interaction with the vitamin D receptor (VDR) (Demay, 2006). Additionally, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ shows antiproliferative properties (Campbell et al., 2000; Banerjee and Chatterjee, 2003), induces cell differentiation and apoptosis,

suppresses cancer invasiveness, and modulates the immune system (Gombart et al., 2006; Deeb et al., 2007; Hawker et al., 2007). $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ analogues are being tested in clinical trials for the treatment of different neoplasias (Hansen et al., 2001; Dalhoff et al., 2003; Lamprecht and Lipkin, 2003; Trump et al., 2004; Deeb et al., 2007).

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ increased TAp73 in a squamous cell carcinoma model, which sensitized cells to cisplatin-mediated growth inhibition and apoptosis (Ma et al., 2008). Li and coworkers observed that vitamin D₃ compounds downregulated survivin mRNA and protein in breast cancer cells, which was associated with vitamin D-induced apoptosis (Li et al., 2005). Survivin overexpression is associated with inhibition of apoptosis, and targeting its function/expression causes spontaneous cell death (Alteri, 2003, 2008; Sampath and Pelus,

Supported by: Fundación MMA, Grant numbers: FIS PI08/0605, ISCIII-RTICC-RD06/0020/0020, ISCIII-ATC and SAF2007-60214.

*Correspondence to: Gemma Domínguez and Félix Bonilla, Department of Medical Oncology, Hospital Universitario Puerta de Hierro, C/ Manuel de Falla, 1, 28220-Majadahonda, Madrid, Spain. E-mail: gdominguez.hpth@salud.madrid.org or fbonilla.hpth@salud.madrid.org

Received 21 April 2010; Accepted 7 August 2010

DOI 10.1002/gcc.20821

Published online 14 September 2010 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).